

**Charakterisierung von Makrophagen im duktalem  
Pankreasadenokarzinom und ihr Einfluss auf prämaligne und  
maligne Pankreasgangepithelzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Sven Ole Helm**

Kiel

2014



Erste Gutachterin: Prof. Dr. Susanne Sebens

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2014

Zum Druck genehmigt: 21.05.2014

gez. Wolfgang J. Duschl, Dekan



Teile dieser Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

**Helm O**, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S (2014) Tumor associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2014 Jan 23. doi: 10.1002/ijc.28736. [Epub ahead of print]

**Helm O**, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg H-H, Wesch D, Sebens S (2014) Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. In press bei PlosOne.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren .....	1
1.1.2 Pathogenese und Pathologie .....	1
1.1.3 Therapieoptionen und –ausblick .....	5
<b>1.2 Makrophagen</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Monozyten - Vorläuferzellen der Makrophagen .....	7
1.2.2 Makrophagen – Funktion und Polarisation .....	7
1.2.3 Makrophagen in der chronischen Entzündung .....	11
1.2.4 Makrophagen in Tumorerkrankungen .....	11
1.2.5 Makrophagen in CP und PDAC .....	13
<b>1.3 Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 Charakteristika der EMT .....	15
1.3.2 EMT und Tumorprogression .....	17
1.3.3 EMT im PDAC .....	18
<b>1.4 Apoptose</b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Apoptosesignalwege .....	19
1.4.2 TRAIL und Rezeptoren .....	19
1.4.3 TRAIL Signaltransduktion .....	20
1.4.4 Apoptoseresistenz im PDAC .....	21
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 Computerprogramme</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4 Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5 Kits</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6 Antikörper</b> .....	<b>33</b>

2.6.1 Antikörper für Westernblot, Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	33
2.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	34
<b>2.7 Primer .....</b>	<b>35</b>
<b>2.8 Oligonukleotide für EMSA-Assays .....</b>	<b>36</b>
<b>2.9 Rezepturen .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Färbung von Paraffinschnitten .....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Immunhistochemische Färbung von CK PAN, $\alpha$ -SMA, Ki67, CD68, CD163 in Paraffinschnitten .....	40
3.1.2 Immunhistochemische Färbung von HLA-DR in Paraffinschnitten.....	40
<b>3.2 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Zelllinien .....	41
3.2.2 Kultivierung von Zelllinien .....	42
3.2.3 <i>In vitro</i> -Generierung von Makrophagen .....	42
3.2.4 Isolierung von humanen TAMs aus PDAC-Gewebe.....	43
3.2.5 Bestimmung der Zellzahl.....	44
3.2.6 Co-Kultur von Epithelzellen und Makrophagen.....	44
3.2.7 Einsatz von Apoptosestimuli .....	46
<b>3.3 Charakterisierung von Makrophagen mittels Durchflusszytometrie .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Protein- und RNA-Gewinnung aus Zelllysaten.....</b>	<b>47</b>
3.4.1 Herstellung von Ganzzelllysaten.....	47
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	48
3.4.3 RNA-Isolierung .....	48
3.4.4 Kombinierte Protein- und RNA-Isolierung.....	48
3.4.5 Herstellung von Kernextrakten.....	49
<b>3.5 cDNA Synthese.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Westernblot.....</b>	<b>50</b>
3.7.1 SDS-Protein-Gelelektrophorese.....	50
3.7.2 Proteintransfer.....	51
3.7.3 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern.....	51
<b>3.8 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) .....</b>	<b>52</b>



<b>3.9 Immunzytochemie und Fluoreszenzfärbung .....</b>	<b>53</b>
3.9.1 Immunzytochemische Färbung von L1CAM und Vimentin .....	53
3.9.2 Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin .....	54
<b>3.10 Invasionsassay mittels modifizierter Boyden-Kammer .....</b>	<b>54</b>
<b>3.11 TGF-<math>\beta</math>1 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>3.12 Bioplex-Analyse .....</b>	<b>56</b>
<b>3.13 Caspase-3/7-Aktivitätsassay .....</b>	<b>57</b>
<b>3.14 Statistische Auswertung .....</b>	<b>58</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Detektion von Makrophagen in chronischen Pankreatitiden und PDACs .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Der Einfluss von TAMs und <i>in vitro</i> generierten Makrophagen auf die EMT und Invasionsfähigkeit von prämaligen und malignen Pankreasgangepithelzelllinien.....</b>	<b>72</b>
4.2.1 Charakterisierung von isolierten PDAC assoziierten Makrophagen und <i>in vitro</i> generierten Makrophagen .....	72
4.2.2 PDAC assoziierte Makrophagen induzieren EMT in H6c7- und Colo357-Zellen .....	78
4.2.3 Titration der Zellzahl von <i>in vitro</i> generierten Makrophagen.....	80
4.2.4 H6c7- und Colo357-Zellen erfahren in Gegenwart von <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen EMT-assoziierte Veränderungen.....	84
4.2.5 M1- und M2-Makrophagen erhöhen die Invasionsfähigkeit von Colo357-Zellen .....	89
4.2.6 M1-Makrophagen weisen nach Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen M2-Charakteristika auf.....	91
4.2.7 GM-CSF inhibiert die Ausprägung von M2-Charakteristika in co-kultivierten M1-Makrophagen .....	95
4.2.8 M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren EMT in H6c7- und Colo357-Zellen. ....	98
<b>4.3 Der Einfluss von <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen auf das Apoptoseverhalten prämaligener und maligner Pankreasgangepithelzelllinien .....</b>	<b>105</b>
4.3.1 M1- und M2-Makrophagen vermindern die Caspase-3/7-Aktivität in H6c7- und Colo357-Zellen nach Stimulation mit TRAIL. ....	105
4.3.2 Die TRAIL-Rezeptorexpression ist in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit Makrophagen weitgehend unverändert. ....	108
4.3.3 Caspase-8 wird nach Stimulation mit TRAIL in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen vermindert aktiviert.....	111

4.3.4 Die Expression von c-FLIP ist in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen erhöht.....	113
4.3.5 Der Transkriptionsfaktor NF-κB wird in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen vermehrt aktiviert.....	114
<b>4.4 Veränderte Konzentrationen von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen aus Co-Kulturen von H6c7- bzw. Colo357-Zellen und M1- bzw. M2-Makrophagen .....</b>	<b>116</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>121</b>
5.1 Charakterisierung von Makrophagen in CP und PDAC .....	123
5.2 Makrophagenplastizität .....	127
5.3 Der Einfluss von verschiedenen Makrophagenpopulationen auf die EMT und Invasion von Pankreasgangepithelzellen.....	129
5.4 Der Einfluss von <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen auf das Apoptoseverhalten von Pankreasgangepithelzellen.....	134
5.5 TAMs als Therapieziel.....	138
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>140</b>
6.1 Zusammenfassung.....	140
6.2 Summary .....	142
<b>Anhang .....</b>	<b>143</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	143
Abbildungsverzeichnis .....	148
Tabellenverzeichnis .....	151
Literaturverzeichnis .....	152
Lebenslauf / Publikationsverzeichnis .....	168
Danksagung .....	171
Erklärung.....	172

# 1. Einleitung

## 1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist mit einer Inzidenz von etwa 20/100.000 Einwohnern in Deutschland eine vergleichsweise seltene Erkrankung. Es zählt aber mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 8 % zu den bösartigsten gastrointestinalen Tumoren und ist die vierthäufigste Ursache für tumorbedingte Todesfälle. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland lag 2010 bei über 16.000 für beide Geschlechter insgesamt, bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 71 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen [1]. Der Grund für diese schlechte Prognose ist die oft späte Diagnose bei fortgeschrittenem Stadium aufgrund schwach ausgeprägter oder fehlender Symptomatik, so dass nur etwa 20 % der Patienten für einen kurativen Eingriff in Frage kommen, da der Tumor zu diesem Zeitpunkt meist schon Metastasen gebildet hat. Die übrigen 80 % der Patienten werden rein palliativ behandelt [2].

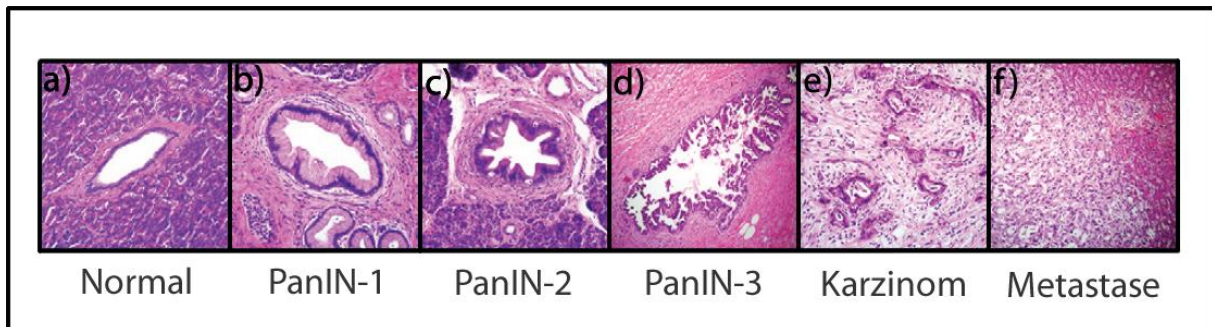
Als gesicherte Risikofaktoren gelten hohes Lebensalter, Rauchen und Adipositas [3,4], vermutet werden darüber hinaus die negativen Auswirkungen von lipidreicher Ernährung und hohem Alkoholkonsum [1]. Das Erkrankungsrisiko steigt ebenfalls bei Patienten mit Typ 2 Diabetes [5,6] oder chronischer Pankreatitis (CP) [7]. Eine genetische Prädisposition wie z.B. im Rahmen der hereditären Pankreatitis kann das Erkrankungsrisiko erhöhen [8,9], ebenso der Einfluss umweltbedingter Schadstoffe wie Nickel und organischer Lösungsmittel [10].

### 1.1.2 Pathogenese und Pathologie

Mit bis zu 92 % aller Fälle stellt das PDAC die häufigste maligne Tumorerkrankung der Bauchspeicheldrüse dar. Abzugrenzen vom PDAC sind das Papillenkarzinom und endokrine Tumore des Pankreas, welche aufgrund frühzeitiger Symptomatik eine im Vergleich wesentlich bessere Prognose aufweisen [2].

Als Ursprung des PDAC wurden bisher 3 bzw. 4 verschiedene Vorläuferläsionen identifiziert. Die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) und muzinöszystischen Neoplasien (MCN) gelten als etablierte Neoplasien, sind jedoch selten [11].

Die bisher als am wichtigsten eingeschätzten Läsionen sind die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Sie werden in 3 Kategorien mit steigendem Dysplasiegrad eingeteilt (**Abbildung 1.1**) und lassen sich in chronischen Pankreatitiden, im Falle von PanIN-1 jedoch auch bereits im gesunden Pankreas mit steigender Inzidenz ab dem 40. Lebensjahr nachweisen [12].



**Abbildung 1.1: Histologische Darstellung von gesunden, interlobulären Pankreasgängen, PanINs und PDACs, modifiziert nach [13].** Gezeigt sind Aufnahmen pankreatischer Gangstrukturen mit steigendem Dysplasiegrad von gesunden interlobulären Gängen (a) über PanINs des Grades 1b bis 3 (b-d) sowie des invasiven Karzinoms und einer Fernmetastase.

Die gesunden pankreatischen interlobulären Ausführungsgänge sind durch hochprismatische, stark polarisierte Zellen, die in einer flachen Gangstruktur angeordnet sind, charakterisiert. Dagegen zeigen bereits PanIN-1 erste Zeichen muzinöser Dysplasie, bei entweder flacher (PanIN-1a) oder papillärer (PanIN-1b) Gangstruktur und basal polarisierten Zellkernen. Die Prävalenz papillärer Strukturen nimmt bei PanIN-2 zu, auch sind nukleäre Dysplasien mit dem Verlust der Polarisation und Veränderungen von Verteilung und Größe zu beobachten. Die Komplexität der Gangstruktur sowie die zelluläre Dysplasie nehmen bei PanIN-3 weiter zu und es kommt zu Abschnürungen von epithelialen Zellkomplexen in das Lumen. PanIN-3 werden auch als *carcinoma in situ* bezeichnet und unterscheiden sich vom Karzinom nur durch den fehlenden Durchbruch der Basallamina und der noch nicht erfolgten Invasion des umliegenden Gewebes [13–16]. Neben den drei bereits dargestellten Vorläuferläsionen wird auch eine azinoduktale Vorläuferläsion als Ursprung für das PDAC diskutiert. Diese entwickelt sich aus azinoduktalen Metaplasien (ADM) über tubuläre Komplexe (TC) zu atypischen flachen Läsionen (AFL), entweder als

eigenständiger Entstehungsmechanismus des PDAC [11] oder als Vorläufer der PanIN-Läsionen [17,18].

Genetische Veränderungen, die typisch für PDACs sind (zusammengefasst in **Tabelle 1.1**), lassen sich auch schon in den Vorläuferläsionen nachweisen. Obwohl es keine Anzeichen für eine wohlgeordnete Abfolge dieser Veränderungen gibt, und auch nicht jede Genmutation in jedem PDAC nachweisbar ist, scheinen einige Mutationen vor anderen zu erfolgen, was mit der Zunahme des Dysplasiegrades der PanINs korreliert. Die Mutation des Onkogens KRAS2 scheint eine der frühesten genetischen Alterationen zu sein und lässt sich in bis zu 95 % der PanIN-1-Läsionen detektieren ebenso wie die Telomerverkürzung. In PanIN-2 wird die Inaktivierung von p16/CDKN2A, in PanIN-3 die Inaktivierung von SMAD4/DPC4 und TP53 häufig beschrieben [12,14].

**Tabelle 1.1: Häufige Genmutationen und zellbiologische Alterationen im PDAC und PanINs**

Gen	Typ	Funktion	Modifikation
KRAS2	Onkogen	Mitogene Signaltransduktion, Regulation der Morphogenese	Permanente Aktivierung
HER2/neu		Stimulation von Proliferation, Hemmung von Apoptose	Genamplifikation, Überexpression
P16/CDKN2A	Tumorsuppressorgen	Regulation von Zellzyklus	Deaktivierung, Repression
TP53		Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Genintegrität	Deaktivierung
SMAD4/DPC4		Regulation von Zellzyklus	Deaktivierung, Repression
BRCA2		DNA-Reparatur	Deaktivierung
NF-κB	<i>Downstream</i> -Effektor	Regulation von Apoptose, Proliferation, Metastasierung/Invasion	Konstitutive Aktivierung
STAT3		Regulation von Apoptose, Proliferation, Metastasierung/Invasion	Konstitutive Aktivierung
Telomer		Regulation Mitose und Apoptose	Verkürzung

Das PDAC ist durch ein ausgeprägtes desmoplastisches Stroma charakterisiert, das bis zu 80 % der Tumormasse ausmachen kann [19]. Es setzt sich aus einem nicht-zellulären und einem zellulären Kompartiment zusammen. Das nicht-zelluläre besteht aus Extrazellulärmatrix (EZM), hauptsächlich Kollagen-I und -III sowie Fibronectin. Die EZM wird hauptsächlich von pankreatischen Fibroblasten bzw. ihrer aktivierten Form, den Myofibroblasten hergestellt, welche einen großen Teil des zellulären Kompartiments des Stromas bilden und durch die Sekretion löslicher Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor-β* (TGF-β), *platelet derived growth factor* (PDGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF2) zu ihrer eigenen Aktivierung und zur

Tumorprogression beitragen [20–23]. Einen weiteren wesentlichen Bestandteil des zellulären Kompartiments stellen verschiedene Typen von Immunzellen dar. Beschrieben ist das vermehrte Auftreten von Mastzellen, myeloiden Suppressorzellen, verschiedenen T-Zell-Populationen und Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs; zusammengefasst in [24]). Bekannt ist der Einfluss der Interaktion von Immunzellen des Stromas und der Tumorzellen auf die Tumorprogression. Für Mastzellen sind beispielsweise die Erhöhung der Proliferationsrate und der Invasionsfähigkeit von pankreatischen Tumorzellen *in vitro* beschrieben [25] und myeloide Suppressorzellen können die gegen Tumorzellen gerichtete zytotoxische T-Zell-Antwort unterdrücken [26]. Die Komposition der T-Zell-Population ist komplex, vor allem werden aber regulatorische T-Zellen und aktivierte T<sub>H</sub>2-Zellen mit Tumorprogression und schlechter Prognose in Verbindung gebracht [27,28]. Die Interaktion von unterschiedlichen Makrophagenpopulationen und pankreatischen Epithel- bzw. Tumorzellen ist das zentrale Thema dieser Arbeit und wird daher in **Kapitel 1.2** detaillierter beschrieben. Als weitere Bestandteile des Stromas des PDAC werden Endothelzellen, peritumorale Nerven und Adipozyten genannt [29].

Diese charakteristische Zusammensetzung wurde ähnlich im umgebenden Stroma von PanINs beobachtet, was die Theorie der Entstehung des PDAC aus PanIN-Läsionen und den Einfluss des Stromas darauf unterstreicht [30,31].

### **1.1.3 Therapieoptionen und –ausblick**

Den einzigen kurativen Therapieansatz für die Behandlung des PDAC stellt bisher nur die partielle Pankreatikoduodenektomie nach Whipple mit dem Ziel der R0-Resektion (mikroskopisch keine Karzinomzellen am Resektionsrand nachweisbar) dar. Adjuvant nach R0-Resektion soll mit Gemzitabin oder 5-FU/Folinsäure therapiert werden, nach R1-Resektion (am Resektionsrand sind Karzinomzellen nachweisbar) wird die additive Therapie mit Gemzitabin oder 5-FU/Folinsäure empfohlen. Für die Palliativtherapie gilt die Chemotherapie mit Gemzitabin als Behandlungsstandard, alternativ ist die Kombinationstherapie mit Gemzitabin und Erlotinib (Tarceva®) oder, bei Patienten mit günstigem Risikoprofil, FOLFIRINOX (5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) möglich. Die Radiotherapie wird in Deutschland nicht empfohlen [32].

Aufgrund des hohen Grades an Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie des Tumors ist derzeit vor allem auch die Identifikation von therapeutischen Zielstrukturen im Stroma Gegenstand der Forschung [33–35]. Dabei wird auch den Tumor-assoziierten Makrophagen große Bedeutung als Therapieziel beigemessen [36–42]. Verschiedene Ansätze werden in **Kapitel 5.5** beschrieben und diskutiert.

Da eine entscheidende Verbesserung der Prognose von PDAC-Patienten bisher nur durch die chirurgische Intervention erreicht werden kann [43], wäre auch ein Screeningverfahren zur Früherkennung sinnvoll. Dafür wäre jedoch zunächst die exakte klinische, morphologische und molekulargenetische Charakterisierung der Vorläuferläsionen sowie eine Verbesserung der Bildgebungsverfahren nötig [11].



## 1.2 Makrophagen

### 1.2.1 Monozyten - Vorläuferzellen der Makrophagen

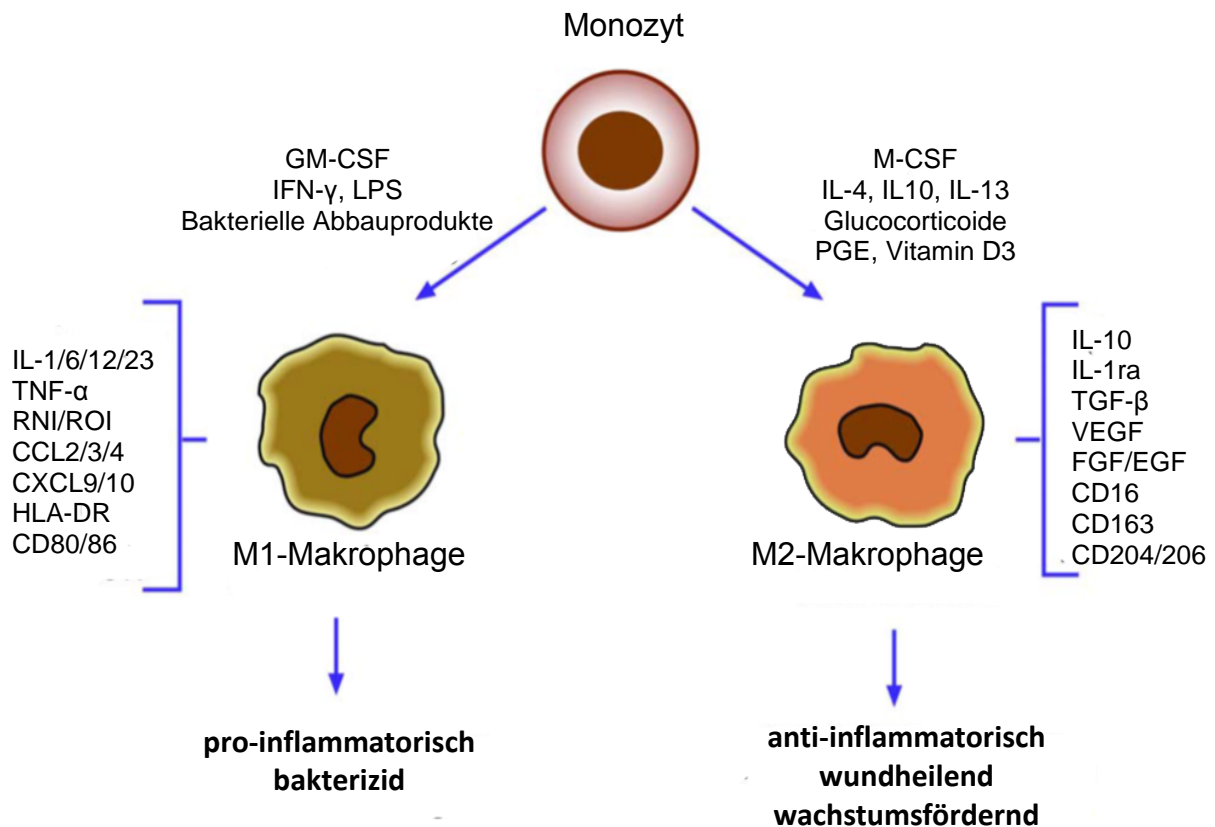
Monozyten stellen als Zellen der myeloiden Zellreihe einen Teil des angeborenen Immunsystems dar. Sie üben Funktionen in der Phagozytose, Antigenpräsentation und Immunregulation aus [44]. Eine wichtige Rolle spielen Monozyten jedoch auch als Vorläufer weiterer, spezialisierter monozytärer Immunzellen. Nach ihrer Differenzierung aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark treten Monozyten in die Blutbahn über und zirkulieren dort bis zu mehreren Tagen, bis sie ins Gewebe einwandern. Dies geschieht entweder kontinuierlich oder vermehrt durch chemotaktische Rekrutierung bei metabolischen, entzündlichen oder anderen immunologischen Prozessen. Die Differenzierung nach dem Eintritt ins Gewebe wird von der Mikroumgebung und ihre Stimuli bestimmt. Dabei reicht das Differenzierungsspektrum der Monozyten von Makrophagen und dendritischen Zellen bis hin zu hochspezialisierten Osteoklasten [45,46].

### 1.2.2 Makrophagen – Funktion und Polarisation

Aus Monozyten differenzierte Makrophagen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose aus, sowohl von Pathogenen als auch von Trümmern apoptotischer und nekrotischer Zellen, aber auch durch die Antigenpräsentation und damit der Interaktion mit T- und B-Zellen der spezifischen Immunabwehr. Die Antigenerkennung geschieht dabei über Mannose- und Glukan-Rezeptoren (*cluster of differentiation* (CD)206), Lipopolysaccharid- (LPS) Rezeptoren (CD14), *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und *Scavenger*-Rezeptoren (CD163, CD204), oder nach Opsonierung durch IgG-Antikörper über Fcγ-Rezeptoren (CD16). Des Weiteren sind Makrophagen in der Lage, ein breites Spektrum an löslichen Faktoren zu sezernieren, beispielsweise pro- und anti-inflammatorische Zytokine sowie Chemokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (RNI, ROI). Die Ausprägung der einzelnen Funktionen hängt dabei jedoch stark vom Stimulus der primären Differenzierung sowie der Aktivierung durch die Mikroumgebung ab [47,48]. Die ersten Berichte über Makrophagenaktivierung stammen aus den 1960er Jahren. Mackaness *et al.* berichteten über eine Antigen-unabhängige Verstärkung der antimikrobiellen Reaktion in Mäusen nach Infektion mit verschiedenen Bakterienstämmen [49]. Wie später bekannt werden sollte, beruhte dies auf einer Aktivierung von Makrophagen durch die

entzündliche Typ-I-Immunreaktion, insbesondere durch das von aktivierten T<sub>H</sub>1-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen freigesetzte Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [47]. Dieser Vorgang wird heute als klassische Makrophagenaktivierung bezeichnet und kann neben IFN- $\gamma$  auch durch *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und Bakterienbestandteile wie LPS induziert werden [40]. Demgegenüber steht die alternative Aktivierung von Makrophagen. Beobachtete Effekte der Interleukine (IL) IL-4, IL-10 und IL-13 auf Makrophagen, sezerniert von T<sub>H</sub>2-Lymphozyten bei der Typ-II-Immunreaktion, wurden in frühen Studien zunächst als deaktivierend interpretiert [47]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Stimuli, ebenso wie Glucocorticoide, Makrophagen zu einem vom klassisch aktivierten abzugrenzenden Phänotyp differenzieren ließen [50,51]. Mittlerweile sind als alternativ aktivierende Stimuli auch *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Prostaglandin E (PGE) und Vitamin D3 identifiziert worden [52].

Das historische Verständnis von klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen bezeichnet allerdings nur die extremen Polarisierungen in einem breiten Spektrum von möglichen Phänotypen mit fließenden Übergängen [53–55]. Unter den vorgeschlagenen Nomenklatorsystemen ist die Unterteilung in zwei Kategorien derzeit noch am gebräuchlichsten. Dabei werden die klassisch aktivierten Makrophagen als M1-, die alternativ aktivierten als M2-Phänotyp bezeichnet, ursprünglich definiert durch die Produktion von IL-12 (M1) bzw. IL-10 (M2). Auf dieser Basis erstmals vorgeschlagen von Mills *et al.* [56], wurde das Bild von der M1- und M2-Polarisation von anderen Arbeitsgruppen aufgegriffen und bezüglich polarisierender Faktoren, phänotypspezifischer Oberflächenmoleküle, Morphologie, Phagozytosefähigkeit und dem Expressionsprofil löslicher Faktoren erweitert [45,47,48,52,57–59]. Ein Überblick über die Charakteristika von M1- und M2-Makrophagen ist in **Abbildung 1.2** dargestellt.

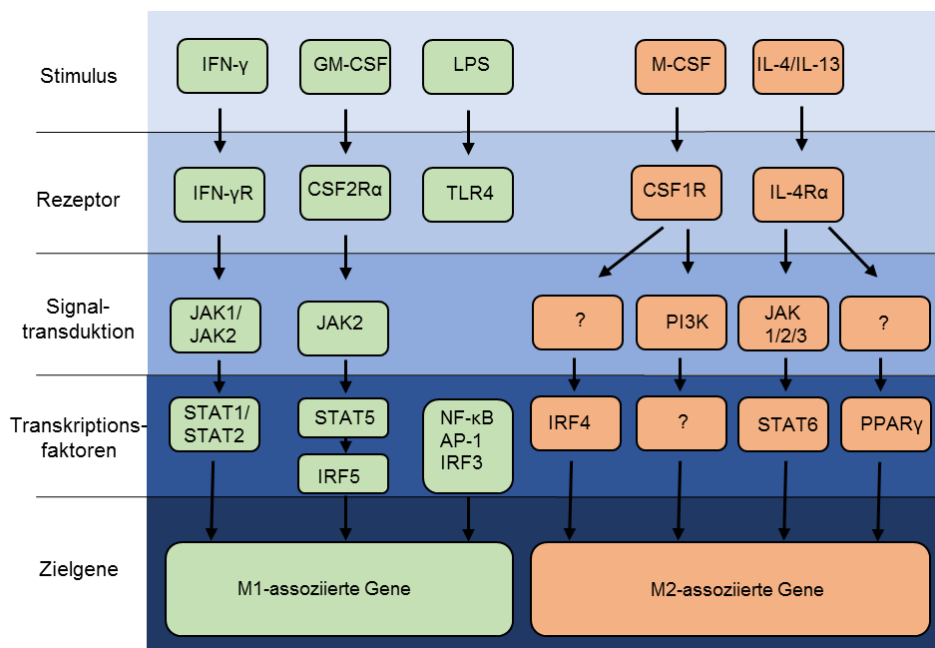


**Abbildung 1.2: Makrophagenpolarisierung nach dem binären System von M1- und M2-Polarisation, modifiziert nach [40].** Die Abbildung zeigt schematisch die Differenzierung von M1- bzw. M2-Makrophagen durch die angegebenen Stimuli, deren charakteristische Oberflächenmarker und lösliche Faktoren (Klammer) sowie allgemeine Funktionen der beiden Phänotypen.

M1-Makrophagen zeichnen sich vor allem durch die Produktion von Zytokinen wie den pro-inflammatorischen Interleukinen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und IL-23 sowie TNF- $\alpha$  aus, welche zur entzündlichen Typ-I-Immunreaktion beitragen. Zusätzlich werden über IL-12 T<sub>H</sub>1- und NK-Zellen weiter aktiviert, über CXCL9 und CXCL10 vermehrt rekrutiert, und die Immunreaktion so noch verstärkt. Ihre bakteriziden Eigenschaften werden über die vermehrte Produktion von RNI und ROI vermittelt. Zusätzlich besitzen M1-Makrophagen eine verstärkte Fähigkeit zur Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle wie HLA-DR sowie die co-stimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 und weisen eine eher kugelförmige Morphologie auf. Demgegenüber zeichnen sich M2-Makrophagen durch verminderte Expression pro-inflammatorischer Zytokine und eine vermehrte Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) aus. Über Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , *vascular endothelial growth factor* (VEGF), FGF und *epidermal growth factor* (EGF) tragen sie zu Wundheilungsprozessen, Angiogenese und Gewebeumbau bei.

Phagozytotisch aktiv sind sie vor allem unspezifisch über *Scavenger*- und Mannose-Rezeptoren. Morphologisch zeichnen sie sich durch eine eher langgestreckte, spindelförmige Zellform aus. [52,60–63]

Die unterschiedlichen Differenzierungsstimuli lösen dabei Signalwege aus, die zur Aktivierung der M1- bzw. M2-typischen Gene führen (zusammengefasst in **Abbildung 1.3**). Die M1-Stimuli IFN- $\gamma$ , GM-CSF und LPS aktivieren TLR4 bzw. die IFN-Rezeptoren- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ , deren Signalwege in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription* (STAT)1 und STAT2, *interferon regulatory factor* (IRF) 3 und IRF5, *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) p65/p50 und *activator protein-1* (AP-1) enden und zur Transkription der M1-assoziierten Gene führen. Die Mechanismen der M2-Polarisierung sind noch nicht vollständig geklärt, beschrieben sind jedoch die Aktivierung von STAT6, IRF4 und *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) als verantwortliche Transkriptionsfaktoren (zusammengefasst in [63,64]).



**Abbildung 1.3: Signaltransduktion der M1- und M2-Polarisierung, modifiziert nach [64].** Schematische Darstellung der Signalwege, die durch unterschiedliche polarisierende Stimuli (IFN- $\gamma$ , GM-CSF, LPS, M-CSF, IL-4 und IL-13) in Makrophagen aktiviert werden und dadurch zur Ausprägung eines M1- oder M2-Phänotyps beitragen. IFN- $\gamma$ R = Interferon- $\gamma$ -Rezeptor; CSF2R $\alpha$  = *colony-stimulating factor 2 receptor alpha*; CSF1R = *colony-stimulating factor 1 receptor*; IL-4R $\alpha$  = *Interleukin-4 Receptor alpha*; JAK = *janus kinase*

In neuere Arbeiten zu diesem Thema werden die Populationen noch weiter differenziert. So wird die Unterscheidung von M2a-, M2b- und M2c-Makrophagen abhängig von der Polarisation durch IL-4 und IL-13, Stimulation von *Toll-like*-Rezeptoren bzw. IL-10 und TGF- $\beta$  beschrieben [48]. Eine Alternative dazu bietet die Einteilung in klassisch aktivierte, wundheilende und regulatorische Makrophagen [54]. In Bezug auf Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) wird jedoch weitestgehend die binäre Nomenklatur von M1- und M2-Makrophagen angewandt, wobei hier aufgrund der Makrophagen-polarisierenden Stimuli, die in der Tumormikroumgebung zum Teil von denen unter physiologischen Bedingungen und im entzündeten Gewebe abweichen, auch die Bezeichnungen M1- und M2-ähnlich gebräuchlich sind [53,63].

### **1.2.3 Makrophagen in der chronischen Entzündung**

Die ersten Beobachtungen von Leukozyten, die vermehrt in maligne erkranktes Gewebe infiltrieren, gehen auf Rudolf Virchow zurück, der daraufhin als erster einen Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Krebs postulierte. Mittlerweile ist die chronische Entzündung als wichtiger Faktor in der Entstehung von Tumoren und als *7th hallmark of cancer* beschrieben [65]. Einen wesentlichen Bestandteil dieser Entzündung stellen Makrophagen dar, die aufgrund ihrer pro-inflammatorischen Eigenschaften dem M1-Phänotyp zugeordnet werden und als Tumor-suppressiv gelten [36,66]. Diskutiert wird jedoch auch ein Beitrag der Makrophagen zur Tumorentstehung, unter anderem durch die mutagenen Eigenschaften der von diesen sezernierten ROI und RNI [67] sowie durch die Förderung von Proliferation, Angiogenese und Invasion durch IL-6 und TNF- $\alpha$  [68,69]. Der Einfluss von Makrophagen in chronischen Entzündungen auf die Tumorentstehung ist allerdings noch nicht vollständig geklärt [36,66,69–71].

### **1.2.4 Makrophagen in Tumorerkrankungen**

Den Großteil des Leukozyteninfiltrats stellen in den meisten Krebsarten Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) dar [53]. Ihre Vorläufer, die Monozyten, werden in vielen Tumorentitäten hauptsächlich über das Chemokin MCP-1/CCL2, welches vermehrt von Tumorzellen produziert wird, aber auch über IL-8/CXCL8, M-CSF, VEGF, IL-10 und TGF- $\beta$  rekrutiert. Nach der Extravasation differenzieren die

Monozyten unter dem Einfluss des Tumormikromilieus zu Makrophagen [40]. Die differenzierenden Stimuli stellen dabei hauptsächlich IL-10, TGF- $\beta$ , PGE und M-CSF dar. Phänotypisch sind die TAMs durch die Expression von Mannose- und *Scavenger*-Rezeptoren (CD163, CD204, CD206), IL-10, der Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF, EGF und TGF- $\beta$  sowie Matrixmetalloproteasen (MMP) charakterisiert. Demgegenüber stehen eine verminderte bis fehlende Produktion reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies, der pro-inflammatorischen Faktoren IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie eine verminderte Antigenpräsentation [40,53]. Dieses Expressionsmuster legt einen M2-ähnlichen Phänotyp der Makrophagen in den meisten Tumoren nahe [72]. Die Anwesenheit von TAMs in vielen Krebserkrankungen wie Tumoren von Brust, Prostata, Endometrium, Ösophagus, Harnblase sowie dem Leiomyosarkom und Gliom wird mit einer schlechten Prognose assoziiert [41,73–76]. Für manche Tumore, wie in Magen und Darm, wird jedoch auch gegenteiliges berichtet [73]. Es ist eine Vielzahl von pro-tumorigenen Effekten durch die von den TAMs sezernierten Faktoren bekannt. So können über die Chemokine CCL13, CCL18 und CCL22 regulatorische T-Zellen (Tregs) rekrutiert werden, welche die Tumor-suppressive Aktivität zytotoxischer T-Zellen unterdrücken [52]. Die Immunsuppression von T-Zellen und B-Zellen wird auch durch das von TAMs produzierte IL-10 vermittelt, welches zusätzlich zum anti-inflammatorischen, M2-ähnlichen Phänotyp der TAMs beiträgt [66]. Durch erhöhte Arginase-1-Aktivität in TAMs wird NO-Synthetasen das Substrat entzogen und so die Produktion zytotoxischer RNI vermindert [47]. Gefördert wird die Angiogenese und damit die Vaskularisierung des Tumors durch TAMs, vor allem nach deren Rekrutierung in hypoxische Tumorareale durch HIF-1 $\alpha$  und CCL2 sowie durch ihre Produktion von VEGF [69]. Dazu tragen auch FGF2 sowie MMP-2 und -9 bei, die VEGF aus Depots in der EZM freisetzen [70]. Ebenfalls durch MMPs wird die EZM verändert und damit die Migration von Tumorzellen erleichtert. Dies geschieht auch durch das von TAMs sezernierte migrationsassoziierte Protein SPARC (*secreted protein acidic rich in cysteine*) [69]. Weitere Mechanismen der Förderung von Migration und Invasion von Tumorzellen durch TAMs sind die Sekretion von TGF- $\beta$  [53,77] sowie die Produktion von EGF. Letzteres erhöht zusätzlich die Expression von M-CSF in den Tumorzellen, wodurch es zu einem parakrinen Rückkopplungsmechanismus mit Förderung der M2-Polarisation und wiederum erhöhter EGF-Expression in den Makrophagen kommt [78].

### 1.2.5 Makrophagen in CP und PDAC

Bezüglich des Einflusses auf die Tumorentstehung und -progression sowie der Charakterisierung von Makrophagen im PDAC sind bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht. Kurahara *et al.* untersuchten ein Kollektiv von 76 PDAC-Patienten immunhistochemisch auf die Anwesenheit von TAMs und deren Korrelation mit der Lymphangiogenese im Tumor und dem Überleben der Patienten. Dabei fanden sie heraus, dass eine verstärkte Präsenz von CD163/CD204+ Makrophagen mit erhöhter Lymphgefäßdichte sowie kürzeren Überlebenszeiten einhergeht [79]. Später berichtete dieselbe Arbeitsgruppe nach einer immunhistochemischen Analyse von 40 weiteren PDACs über eine vermehrte Produktion von VEGF-C in CD163+ Makrophagen als Ursache für die vermehrte Lymphangiogenese [80].

Eine andere immunhistochemische Studie an 212 PDACs zeigte ebenfalls eine Korrelation der erhöhten Anzahl von CD163+ und CD204+ Makrophagen und schlechterem Überleben der Patienten, wies aber auch einen Zusammenhang zwischen vermehrter Anwesenheit von CD68/HLA-DR+ Makrophagen und längerer Überlebensdauer auf [81]. Yoshikawa *et. al* führten ebenfalls eine immunhistochemische Untersuchung durch, bei der neben 107 PDACs auch Präparate von 11 CPs parallel analysiert wurden. Anhand von CD204 wurden M2-Makrophagen identifiziert und deren vermehrtes Vorkommen in PDACs mit dem in CPs verglichen sowie die Korrelation von hoher Zellzahl an CD204+ Makrophagen und schlechter Prognose für PDAC-Patienten aufgezeigt [82].

Bisher sind auch wenige Arbeiten mit *in vitro* Co-Kulturmodellen von Pankreasgangepithelzelllinien und Makrophagen oder entsprechenden Mausmodellen veröffentlicht. Gezeigt wurde bereits der Einfluss von IL-10-polarisierten murinen Makrophagen auf die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) von PDAC-Zellen (Panc-1 und Bx-PC-3) durch Sekretion von IL-10 [83]. Eine andere Arbeit konnte die pro-invasive Wirkung von M-CSF-polarisierten Maus-Makrophagen *in vitro* auf die murinen Pankreasgangepithelzelllinien ID8 und Panc02 sowie *in vivo* im Mausmodell, durch CD204 [84] demonstrieren. Des Weiteren wurde die Entstehung von ADMs durch von Makrophagen sezerniertes TNF- $\alpha$  und CCL5/RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) unter Aktivierung von NF- $\kappa$ B *in vivo* und *in vitro* gezeigt [18], die Anwesenheit von CD68+ Makrophagen mit erhöhter Inzidenz von Lymphknotenmetastasen im Mausmodell korreliert [85] und die

Steigerung der perineuralen Invasion von Tumorzellen durch M-CSF-aktivierte Makrophagen im Mausmodell des PDAC [86] dargestellt.

Eine umfassende Charakterisierung von TAMs aus humanem PDAC-Gewebe und *in vitro* Untersuchungen im rein humanen System fehlen jedoch bisher.



## 1.3 Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

### 1.3.1 Charakteristika der EMT

Die EMT beschreibt den Prozess der Veränderung von einem polarisierten, epithelialen in einen motilen, mesenchymalen Phänotyp. Diese beiden Phänotypen wurden lange Zeit als stabil betrachtet und die EMT war nur als Teil der Embryonalentwicklung bekannt. Erst 1982 wurde sie von Greenburg und Hay in adulten Epithelien nachgewiesen und definiert [87].

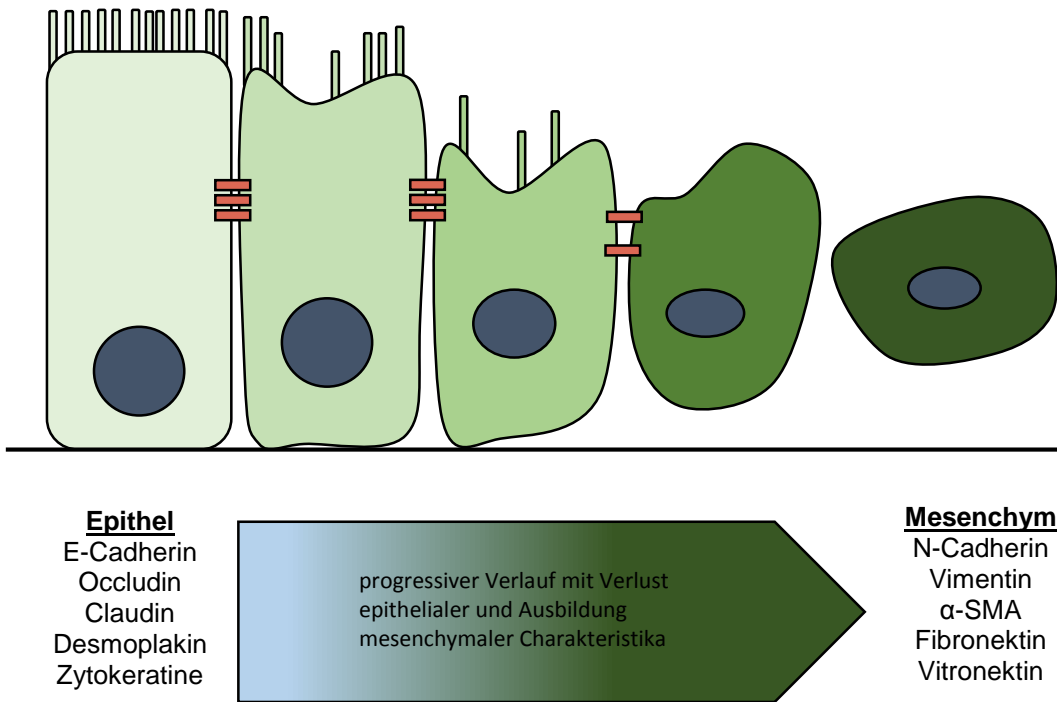
Epithelien sind Verbände aus polarisierten Zellen mit definierten apikalen und basolateralen Domänen, mit häufiger Ausbildung von Spezialisierungen wie Mikrovilli bzw. Adhäsionskomplexen. Sie bedecken die meisten Körperoberflächen und kleiden eine Vielzahl von Lumina im Körper aus. Über eine Basallamina sind die Epithelzellen mit der EZM verbunden [87,88]. Den Zusammenhalt des Epithels gewährleisten Zell-Zell-Kontakte wie *Adherent Junctions*, *Tight Junctions*, *Gap Junctions* und Desmosomen. Als charakteristischer Proteinmarker für Epithelzellen gilt das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, welches einen Bestandteil der *Adherent Junctions* und Desmosomen bildet und mit Immunglobulinen benachbarter Zellen sowie über die intrazelluläre Domäne mit den Cateninen des Aktin-Zytoskeletts interagiert und so frühe Zell-Zell-Kontakte bildet [88]. Des Weiteren werden als Epithelmarker die Proteine Occludin und Claudin, beide Bestandteile der *Tight Junctions* [89], Desmoplakin, ein Protein der Desmosomen [90], und die Zytokeratine, eine Gruppe der Intermediärfilamente, [91] herangezogen.

Mesenchymale Zellen liegen dagegen meist lose verteilt in der EZM vor [88], wobei zu anderen Zellen meist nur fokale Kontakte ausgebildet werden. Ihnen fehlen der polarisierte Aufbau von Epithelzellen und der Kontakt zur Basallamina, die Morphologie ist spindel- oder sternförmig und sie weisen eine hohe Migrationsfähigkeit auf [92,93]. Typische Marker mesenchymaler Zellen sind das Intermediärfilament Vimentin, das Adhäsionsmolekül N-Cadherin,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA), die extrazellulären Glykoproteine Fibronectin und Vitronectin [92] sowie das Fibroblastenspezifische Protein-1 (FSP-1) [94]. Eine vermehrte Expression der Transkriptionsfaktoren Slug und Snail [95] sowie der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 [96] sind ebenfalls charakteristisch.

Im Verlauf der EMT entwickeln sich Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp. Dies kann durch eine Reihe von löslichen Faktoren

eingeleitet werden, insbesondere durch EGF, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) und die Mitglieder der TGF- $\beta$ - und FGF-Familien. Diese Faktoren aktivieren GTPasen der Rho-, Ras- und Rac-Familien oder Src-Tyrosinkinasewege, die ihrerseits letztlich Transkriptionsfaktoren wie Slug, Snail, Twist und SIP1 aktivieren [92]. Ebenso sind die Wnt-, Notch- und Integrin-Signalwege für die Induktion der EMT von Bedeutung [97,98]. Als die wichtigsten Induktoren der EMT gelten TGF- $\beta$ 1-3. Neben der Smad-unabhängigen Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPkinasen) ERK, p38, JNK und AKT über die Ras-GTPasen führt TGF- $\beta$ 1 auch über die Phosphorylierung von Smad-2 und -3 zur Regulierung EMT-assoziiierter Gene [99,100]. Ebenfalls beschrieben sind die Auswirkungen von sauerstoffarmer Umgebung (Hypoxie) auf die EMT über die Hochregulation von *hypoxia-inducible faktor 1- $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ), HGF, Snail und Twist sowie die Aktivierung der Notch- und NF- $\kappa$ B-Signalwege [98]. Die EMT kann ferner über Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  und IL-1 induziert werden [101].

Als Folge der vielfältigen induzierenden Signale kommt es zur Repression des E-Cadherin-Gens, was einen wichtigen Schritt in der Initiation der EMT darstellt. Es folgt die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte, auch bedingt durch die Repression von Occludin und Claudin sowie die Translokation des zuvor an E-Cadherin gebundenen  $\beta$ -Catenins in den Zellkern. Dort trägt  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor-Untereinheit zur Aktivierung EMT-relevanter Gene und der Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA und Fibronectin bei, was auch zur Neuorganisation des Zytoskeletts unter Annahme einer mesenchymalen, spindelförmigen Morphologie führt [98,102]. Eine schematische Übersicht über den Phänotyp von Zellen im Verlauf der EMT ist in **Abbildung 1.4** dargestellt.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung EMT-assoziierter Veränderungen in Epithelzellen, modifiziert nach [103].**

### 1.3.2 EMT und Tumorprogression

Die EMT spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und konnte in vielen Tumorentitäten beobachtet werden [98,104,105]. Sie leistet dabei einen entscheidenden Beitrag zur Invasivität der Tumorzellen, der Bildung von Metastasen und der Therapieresistenz [98]. Dabei zeigen sich phänotypische Veränderungen wie unter 1.3.1 beschrieben. Eine Verminderung der E-Cadherinexpression konnte auch in diversen Karzinomen, wie Tumoren des Magens und des Darms gezeigt werden [95,106,107]. Diese wird vor allem durch die transkriptionale Repression über die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, SIP1, ZEB-2 und Twist ausgelöst, die in verschiedenen Tumoren unterschiedlich stark überexprimiert werden [95]. Vermindert exprimiert werden weitere epitheliale Proteine wie Claudin und Occludin [97]. Die Überexpression von Snail führt auch zur Ausbildung mesenchymaler Charakteristika wie einer erhöhten Expression von Fibronektin und Vitronektin [97] und fördert die Metastasierung [108]. Initiiert wird die Expression der verantwortlichen Transkriptionsfaktoren über lösliche Faktoren. Als wichtigster Induktor der EMT in der

Karzinogenese gilt TGF- $\beta$  [109], weitere sind *bone morphogenic protein* (BMP), HGF und FGF [98].

Ein weiteres Protein, das mit der EMT in der Karzinogenese assoziiert wird, ist das Adhäsionsmolekül L1CAM. Dieses gehört zur Familie der Immunoglobulin-adhäsionsmoleküle (IgCAM) und wurde ursprünglich im Nervensystem identifiziert und dort mit neuronaler Adhäsion und Migration in Verbindung gebracht [110]. Mittlerweile ist es aber auch in vielen Tumoren nachgewiesen worden, in denen es abhängig von TGF- $\beta$  und Snail exprimiert wird [111] und mit Apoptoseresistenz, gesteigerter Zellmotilität [112–114] sowie mit schlechter Prognose in assoziiert ist [115].

### **1.3.3 EMT im PDAC**

Aufgrund seiner häufigen und frühen Metastasierung wird auch für das PDAC eine wichtige Rolle der EMT diskutiert. So steht die verminderte Expression von E-Cadherin in Tumorzellen des PDAC in Zusammenhang mit schlechter Prognose [116], ebenso wie die vermehrte Expression von L1CAM [117]. Auch lassen sich die EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und TWIST sowie die mesenchymales Vimentin und N-Cadherin in PDAC-Zellen vermehrt detektieren [118]. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der L1CAM-Expression von der TGF- $\beta$ -induzierten Slug-Aktivierung in Pankreasgangepithelzelllinien gezeigt [111] sowie der Zusammenhang von L1CAM-Expression und Chemoresistenz [113].

Zeichen der EMT lassen sich schon in den Vorläuferläsionen des PDAC nachweisen. Bergmann *et al.* konnten eine Expression von L1CAM in bis zu 35 % der untersuchten PanIN-Läsionen sowie in nahezu 100 % untersuchten PDAC-Gewebe nachweisen [119]. In einer anderen Studie wurde in 65 % der untersuchten CP-Gewebe eine erhöhte L1CAM-Expression in stromanahen Gangstrukturen detektiert [111]. Diese Befunde stehen im Einklang mit denen einer anderen Arbeitsgruppe, die im Mausmodell EMT und Invasion von Pankreasgangepithelzellen schon in frühesten Stadien von pankreatischen Läsionen feststellen konnte [120].

## 1.4 Apoptose

### 1.4.1 Apoptosesignalwege

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein physiologischer Mechanismus zum regulierten Abbau von Zellen, die vom Körper nicht länger benötigt werden, wie z.B. Immunzellen nach erfolgter Immunabwehr, zur Begrenzung von Gewebewachstum und zur Beseitigung potentiell gefährlicher Zellen. Davon abzugrenzen ist die pathologische Nekrose [121]. Es existieren zwei Wege der Apoptoseinitiation, der extrinsische und der intrinsische Weg. Letzterer wird durch Verlust von Kontrollen im Zellzyklus oder von Überlebensfaktoren, DNA-Schäden, die z.B. durch äußere Einflüsse wie Strahlung, Noxen oder auch Therapie mit Zytostatika entstehen sowie andere Ursachen für schweren Zellstress aktiviert und über p53 und die Mitochondrien vermittelt. Der extrinsische Weg hingegen wird über Todesrezeptoren und ihre Liganden wie TNF- $\alpha$ , *first apoptosis signal ligand* (FASL) oder *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) aktiviert [121–123]. Dieser wird unter 1.4.3 am Beispiel der TRAIL-vermittelten Signaltransduktion genauer erläutert. Beiden Apoptosewegen gemein ist die zentrale Bedeutung von Cysteinproteasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*, Caspasen), die in zwei Gruppen unterteilt werden können und zunächst in ihrer inaktiven Form als Procaspasen vorliegen. Die Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8, -9 und -10) werden nach der Todesrezeptor- oder Mitochondrienaktivierung ihrerseits proteolytisch aktiviert und schneiden die Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3 und -7) in ihre aktive Form, welche dann DNA und zelluläre Proteine fragmentieren und so den Zelltod einleiten [121].

### 1.4.2 TRAIL und Rezeptoren

TRAIL ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit einer Extrazellulärdomäne, die Sequenzhomologien zu TNF- $\alpha$  und FASL zeigt [122]. Diese Extrazellulärdomäne kann proteolytisch abgespalten werden [124] und interagiert unter Bildung von Homotrimeren mit 4 bisher bekannten homologen, membrangebundenen Rezeptoren. Von diesen besitzen nur *death receptor 4* (DR4) und *death receptor 5* (DR5) eine intrazelluläre Todesdomäne, die zur Weiterleitung eines Apoptosesignals unerlässlich ist. *Decoy receptor 2* (DcR2) hat eine nicht funktionale Todesdomäne, während *decoy receptor 1* (DcR1) gar keinen intrazellulären Teil besitzt. Beide *decoy*-Rezeptoren konkurrieren mit DR4 und DR5 um TRAIL als Bindungspartner, leiten aber keine

Apoptose ein und können bei Überexpression TRAIL-induzierte Apoptose unterdrücken (zusammengefasst in [125]).

### 1.4.3 TRAIL Signaltransduktion

Die Bindung von TRAIL an DR4 oder DR5 führt zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Aggregation der intrazellularen Todesdomänen. Dadurch wird das Adaptermolekül *fas-associated death receptor* (FADD) rekrutiert, welches die Anlagerung großer Mengen Procaspase-8/FLICE und deren gegenseitige proteolytische Aktivierung ermöglicht. Diese Formation wird als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet und kann durch die Anlagerung des Proteins *cellular FLICE-like inhibitory protein* (c-FLIP) an FADD inhibiert werden. In Zellen des sogenannten Typ I wird daraufhin von der aktivierten Initiatorcaspase-8 die Effektorcaspase-3 durch Spaltung aktiviert, welche für Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung verantwortlich ist [121,122,125]. In Typ II-Zellen reicht die Menge der im DISC aktivierten Caspase-8 nicht für eine direkte Aktivierung der Effektorcaspasen aus. Es erfolgt daher eine Verknüpfung des ex- und intrinsischen Weges durch proteolytische Aktivierung von Bid, einem Protein der pro-apoptischen Bcl-2-Familie, welches daraufhin zum Mitochondrium transloziert und dort durch Interaktion mit weiteren Bcl-2 Molekülen (BAX und BAK) die Freisetzung von Zytocrom-C aus den Mitochondrien verursacht, welches über Caspase-9 letztlich zur Aktivierung von Caspase-3 führt [126]. Eine Übersicht der Signalwege ist in **Abbildung 1.5** dargestellt.

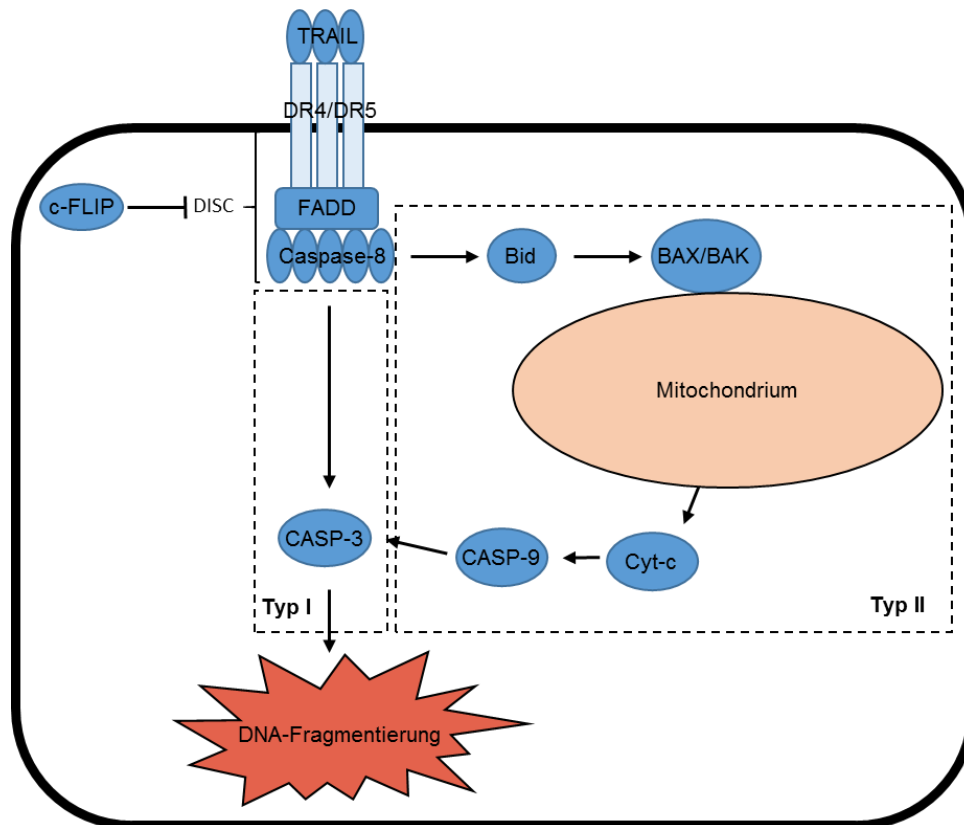


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des TRAIL-Signalwegs, modifiziert nach [125].

#### 1.4.4 Apoptoresistenz im PDAC

Eine Resistenzbildung gegenüber den verschiedenen Mechanismen, die die Apoptose einleiten, ist ein bekanntes Merkmal von Krebserkrankungen, welches die Tumorigenese überhaupt erst ermöglicht bzw. zur Therapieresistenz beiträgt. Am häufigsten bildet sich eine Resistenz gegenüber dem intrinsischen Apoptoseweg über die deaktivierende Mutation von TP53 aus. Beispiele anderer Möglichkeiten sind die verminderte Expression pro-apoptotischer (z.B. BAX und BAK), die Überexpression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) oder deaktivierende Veränderungen im extrinsischen Apoptoseweg [127].

Das PDAC zeichnet sich unter anderem durch seine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapie aus, wobei die Wirkmechanismen von Zytostatika im Wesentlichen auf der Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg durch v.a. DNA-Schädigung beruhen [128]. Auch die verminderte Sensitivität von pankreatischen Tumorzellen gegenüber Aktivatoren des extrinsischen Weges sind beschrieben [129]. Die Mechanismen der Apoptoresistenz sind dabei vielfältig. Die deaktivierende

TP53-Mutation findet sich häufig im PDAC [130]. Des Weiteren beschrieben sind die Überexpression der Mitglieder der *inhibitors of apoptosis* (IAP) –Familie cIAP2 und Survivin, welche Effektorcaspasen inhibieren und sich schon in PanIN-Vorläuferläsionen nachweisen lassen [131,132]. Ebenfalls dokumentiert ist die Überexpression von c-FLIP [128] und *FAS-associated –phosphatase-1* (FAP-1) [133], welche die Aktivierung von Caspase-8 im DISC blockieren sowie eine deregulierte Expression der Bcl-2-Proteine [128]. Eine wichtige Rolle für die Apoptoseresistenz von PDAC-Zellen spielt auch das in diesen konstitutiv überexprimierte NF-κB, welches die Expression von Proteinen wie Bcl-X<sub>L</sub> und c-FLIP reguliert. Durch die Inhibition von NF-κB wird daher die Resistenz gegenüber Zytostatika und Todesliganden vermindert [134–136]. Ebenfalls beschrieben ist die epigenetisch bedingte, verminderte Expression von Caspase-3, -7, -8 und -9 in Pankreasgangepithelzellen durch den Einfluss von Myofibroblasten, über den diese zur Apoptoseresistenz beitragen [22].



## 1.5 Ziel der Arbeit

Tumor-assoziierte Entzündungsprozesse haben im vergangenen Jahrzehnt an Beachtung gewonnen und werden mittlerweile zu den charakteristischen Kennzeichen von Krebserkrankungen gezählt [127]. Der Beitrag von Tumor-assoziierten Makrophagen mit M2-ähnlichem Phänotyp zur Tumorprogression findet ebenfalls gemeinhin Akzeptanz, doch in vielen Studien werden TAMs nur anhand eines bzw. zwei charakteristischer Marker wie CD163 und/oder CD204 als M2-polarisiert charakterisiert [79,82,85]. Es existieren jedoch auch Berichte über andere Makrophagenpopulationen in Tumoren, wie gemischte Phänotypen von M1- und M2-Makrophagen [137,138] oder die Anwesenheit von M1- und M2-Populationen im selben Tumor, abhängig von Norm- oder Hypoxie und Nähe zu Tumorzellen [139–141].

Für das PDAC fehlen bisher eine umfangreiche Charakterisierung von TAMs und die Untersuchung ihres Einflusses auf das maligne Pankreasgangepithel. Weiterhin fehlt eine vergleichende Untersuchung von Makrophagen im PDAC und seiner möglichen Vorläufererkrankung, der chronischen Pankreatitis, unter Berücksichtigung von M1- und M2-Charakteristika.

In dieser Arbeit sollten daher die Prävalenz und die Phänotypen von Makrophagen in chronischer Pankreatitis und PDAC vergleichend untersucht werden, unter Berücksichtigung von M1- und M2-Markern sowie deren Lokalisation im erkrankten Gewebe. Dazu stand ein Kollektiv von 42 PDAC- und 15 CP-Präparaten zur Verfügung, die immunhistochemisch analysiert werden sollten. Des Weiteren sollte der Phänotyp von frisch aus PDAC-Geweben isolierten TAMs anhand von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie und des Zytokinexpressionsprofils mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion dezidiert charakterisiert werden. Für deren Einordnung sollten parallel dazu sollten *in vitro* generierte Makrophagen mit reinem M1- bzw. M2-Phänotyp generiert und analysiert werden.

In einem *in vitro* Versuchsaufbau sollten die drei Makrophagenpopulationen mit prämaligen (H6c7) und malignen (Colo357) Pankreasgangepithelzelllinien co-kultiviert werden, um den Einfluss von TAMs auf das Epithel mit dem der polarisierten Makrophagen zu vergleichen. Dabei sollte der Einfluss der Makrophagen auf die Induktion von EMT in den Epithelzellen sowie mögliche Veränderungen in deren Ansprechen auf Apoptosestimuli untersucht werden.

Auf diese Weise sollte zu einem besseren Verständnis des Phänotyps sowie der Rolle von Makrophagen in der Entstehung und der Progression des PDAC beigetragen werden.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

<b>AE2000</b>	Motic, Wetzlar, D
<b>Axioskop 40</b>	Zeiss, Jena, D
<b>Axiovert 25</b>	Zeiss, Jena, D
<b>BBD 6220 CO<sub>2</sub>-Incubator</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Bio-Plex® 200 Reader</b>	Bio-Rad Laboratories, München, D
<b>BZ-9000</b>	Keyence, Neu-Isenburg, D
<b>CS-300V Powersupply</b>	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
<b>Evo<sub>s</sub>XL Core</b>	AMG, Bothell, USA
<b>FACScalibur™ Durchflusszytometer</b>	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
<b>Filmentwickler Curix 60</b>	Agfa, Düsseldorf, D
<b>Finnpipette 0.2-2 µl</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Finnpipette 100-1000 µl</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Finnpipette 20-200 µl</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Finnpipette 2-20 µl</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Fusion SL Detektionssystem</b>	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
<b>GyroTwister Schwänker</b>	Labnet, Woodbridge, USA
<b>HERA Cell 240 Brutschrank</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>HERA Safe</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>HERA Safe KS</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Heraeus Biofuge pico</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Heraeus Fresco 17</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Heraeus Multifuge 3 S-R</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D

<b>Heraeus Multifuge X1</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>Heraeus Pico 17</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>HERAFreeze Basic Tiefkühler (-80°C)</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D
<b>IKA Vortex Genius 3</b>	IKA-Werke, Stauffen, D
<b>Kühlschrank (4°C)</b>	Liebherr, Ochsenhausen, D
<b>LightCycler 480 II</b>	Roche, Basel, CH
<b>MACS Multistand</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
<b>Microplate Luminometer LB96V</b>	Berthold Technologies, Pforzheim, D
<b>NanoDrop Spectrophotometer 10-1000</b>	PeqLab, Erlangen, D
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
<b>OmniPAGE VS10D Gelkammer</b>	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
<b>pH 7110 pH-Meter</b>	inoLab, Weilheim, D
<b>Pipetboy-acu</b>	Integra-Biosciences, Fernwald, D
<b>PMS 1000 Microplate Shaker</b>	Grant bio, Essex, UK
<b>Precisa BJ 2100D</b>	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
<b>Precisa XB120A</b>	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
<b>QBA1 Tisch-Inkubator</b>	Grant, Cambridge, UK
<b>Ripette</b>	Ritter, Schwabmünchen, D
<b>Rotina 420 R</b>	Hettich, Tuttlingen, D
<b>SD20 Semi Dry Maxi Transferkammer</b>	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
<b>Sonicator Sonoplus</b>	Bandelin, Berlin, D
<b>Sprout mini centrifuge</b>	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
<b>Stuart SRT9 Rollermixer</b>	Bibby Scientific Ltd. , Stone, UK

<b>Sunrise Remote Control</b>	Tecan, Crailsheim, D
<b>Tiefkühler (-20°C)</b>	Liebherr, Ochsenhausen, D
<b>Vakuumpumpe Laboport</b>	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
<b>WNB 7-45 Wasserbad</b>	Memmert, Schwabach, D
<b>WTC ED-53 Inkubationsschrank</b>	Binder, Tuttlingen, D

## 2.2 Computerprogramme

<b>Axiovision Rel. 4.6</b>	Carl Zeiss AG, Jena, D
<b>Bio-Plex® Manager Software</b>	Bio-Rad Laboratories, München, D
<b>BZ-9000 Image Analysis Application</b>	Keyence, Neu-Isenburg, D
<b>FACScalibur Software CellQuest</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Fusion CAPT Software 16.06</b>	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
<b>LightCycler480 Software</b>	Roche, Basel, CH
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<b>SigmaPlot 12.5</b>	Systat Software Inc., Chicago, USA
<b>WinMDI 2.8</b>	Freeware, entwickelt von Joe Trotter

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

<b>1,5 ml / 2 ml Eppendorfgefäße</b>	Eppendorf, Hamburg, D
<b>12-/ 24-/ 96-Well-Flachbodenplatten</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>12-Well-Transwelleinsätze,</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>Porengröße 0,4 µm</b>	
<b>15 ml/50 ml Röhrchen</b>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<b>18 mm Deckgläser</b>	Menzel GmbH, Braunschweig, D

<b>20 µl / 200 µl / 1000 µl Pipettenspitzen</b>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<b>24-Well-Transwelleinsätze, 8 µm Porengröße</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>25 µl / 50 µl / 100 µl Ritips</b>	Ritter, Schwabmünchen, D
<b>5 ml / 10 ml / 25 ml serologische Pipetten</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>96-Well-PCR-Platten, weiß</b>	Roche, Basel, CH
<b>96-Well-Rundbodenplatten</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>BD Falcon Cell Strainer, 40 / 100 µm</b>	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
<b>CryoPure Gefäß 1,0 ml weiß</b>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<b>FACS-Röhrchen</b>	Sterilin, London, UK
<b>MACS-LS Columns</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
<b>Nitril-Untersuchungshandschuhe</b>	Ansell GmbH, München, D
<b>Objektträger 76 x 26 mm SuperFrost</b>	Menzel GmbH, Braunschweig, D
<b>Parafilm „M“</b>	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, D
<b>Serumpipette 153 mm, lang</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>Skalpell</b>	Feather, Osaka, J
<b>VueLife® FEP Bag, 32 ml</b>	Süd-Laborbedarf, Gauting, D
<b>Wattestäbchen</b>	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter, D
<b>Whatman-3MM Filterpapier</b>	FE Healthcare, Buckinghamshire, UK

## 2.4 Chemikalien und Reagenzien

<b>6-Aminocaprinsäure</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>AEC Substrat Chromogen Ready-to-Use</b>	Dako Diagnostika, Hamburg, D
<b>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</b>	Merck Millipore, Darmstadt, D
<b>Aprotinin aus Rinderlunge</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>Borsäure</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>Bromphenolblau</b>	Th.Geyer GmbH, Renningen, D
<b>BSA, Fraktion V</b>	Biomol, Hamburg, D
<b>CD11b-MicroBeads</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
<b>CH11</b>	Coulter Immunotech, Hamburg, D
<b>Clarity Western ECL Substrat</b>	Bio-Rad Laboratories, München, D
<b>DL-Dithioereitol (DTT)</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>DMEM Medium</b>	PAA, Pasching, A
<b>EDTA</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>EGF, <i>human recombinant</i></b>	Life Technologies, Darmstadt, D
<b>EnVision + System-HRP <i>anti mouse</i></b>	Dako Diagnostika, Hamburg, D
<b>Essigsäure 10 %</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Ethanol</b>	Merck Millipore, Darmstadt, D
<b>Etoposid</b>	Hexal, Holzkirchen, D, über Apotheke des UKSH Campus Kiel
<b>FcR Blocking Reagent <i>human</i></b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
<b>Fixation/Permeabilization Concentrate</b>	eBioscience, Frankfurt a.M., D.

<b>FluorSave Reagent</b>	Merck Millipore, Darmstadt, D
<b>Fötale Kälberserum (FCS)</b>	Biochrom AG, Berlin, D
<b>Gemzitabin</b>	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, D, über Apotheke des UKSH Campus Kiel
<b>Glycerol 80 %</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>GM-CSF, <i>human recombinant</i></b>	BioLegend, Fell, D
<b>Hanks Balanced Salt Solution with calcium</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>HEPES</b>	Biochrom AG, Berlin, D
<b>Hoechst 33258</b>	Sigma-Adrich, München, D
<b>Hyaluronidase</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>Kaiser's Glyceringelatine</b>	Waldeck GmbH, Münster, D
<b>KCl</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Keratinocyten serumfreies Medium</b>	Life Technologies, Darmstadt, D
<b>KillerTRAIL, <i>soluble human recombinant</i></b>	Enzo Life Science, Lörrach, D
<b>Kollagen Typ I (Kalbshaut)</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>Kollagenase-I</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>Kristallviolett-Lösung</b>	Walter CMP, Kiel, D
<b>L-Glutamin</b>	PAA, Pasching, A
<b>LightCycler480 SYBR Green I Master</b>	Roche, Basel, CH
<b>Mayer's Haemalaun</b>	Appllichem, Darmstadt, D
<b>M-CSF, <i>human recombinant</i></b>	BioLegend, Fell, D
<b>Methanol</b>	Th.Geyer GmbH, Renningen, D



<b>Milchpulver</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Natriumpyruvat 100 mM</b>	Biochrom AG, Berlin, D
<b>PageRuler</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>PBS</b>	PAA, Pasching, A
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	PAA, Pasching, A
<b>Permeabilization Buffer (10x)</b>	eBioscience, Frankfurt a.M., D.
<b>PMSF</b>	Sigma-Aldrich, München, D
<b>PVDF-Membran</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Rinderhypophysenextrakt (BPE)</b>	Life Technologies, Darmstadt, D
<b>Rotiphorese Gel 40</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>RPMI 1640 Medium</b>	Biochrom, Berlin, D
<b>SDS ultra-pure</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>TEMED</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Tris-Base</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<b>Triton X-100</b>	Sigma-Adrich, München, D
<b>Trypsin-EDTA</b>	PAA, Pasching, A
<b>Tween 20</b>	Serva, Heidelberg, D
<b>Xylol</b>	Th.Geyer GmbH, Renningen, D

## 2.5 Kits

<b>Bio-Plex® Pro Assay</b>	Bio-Rad Laboratories, München, D
<b>Caspase-Glo® 3/7 Assay</b>	Promega, Mannheim, D
<b>NucleoSpin® RNA/Protein</b>	Macherey-Nagel, Düren, D
<b>peqGOLD Total RNA Kit</b>	PeqLab, Erlangen, D
<b>Quantikine® Human TGF-β1 Immunoassay</b>	R&D Systems, Minneapolis, USA
<b>Proteinassay DC</b>	Bio-Rad Laboratories, München, D
<b>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	Thermo Scientific, Schwerte, D

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Antikörper für Westernblot, Immunhistochemie und Immunzytochemie

Primärantikörper				
Antigen (Klon)	Firma	Spezies/ Isotyp	Verdünnung 1.AK/2.AK (Westernblot)	Verdünnung 1.Ak/2.AK (Färbung)
<b>β-Aktin (Ac-15)</b>	Abcam, Cambridge, UK	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:50000/1:20000	-
<b>Caspase-3 (3G2)</b>	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:1000/1:2000	-
<b>Caspase-8 (1C12)</b>	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:1000/1:2000	-
<b>c-FLIP (NF6)</b>	Alexis, Lörrach, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:500/1:3000	-
<b>DcR1/Trail-R3 Cat. IMG-245-1</b>	Imgenex, San Diego, USA	Kaninchen/ polyklonal	1:2000/1:6000	-
<b>DcR2/Trail-R4 Cat. IMG-121-1</b>	Imgenex, San Diego, USA	Kaninchen/ polyklonal	1:4000/1:6000	-
<b>DR4/Trail-R1 Cat.AB16955</b>	Merck Millipore, Darmstadt, D	Kaninchen/ polyklonal	1:1000/1:6000	-
<b>DR5/Trail-R2 Cat.3696</b>	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Kaninchen/ polyklonal	1:500/1:3000	-
<b>E-Cadherin (32A8)</b>	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:1000/1:2000	1:50/1:500
<b>HLA-DR (CR3/43)</b>	Zytomed GmbH, Baden-Baden, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	-	1:25/-**
<b>HSP90 (H-114)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Kaninchen/ polyklonal	1:2000/1:2000	-
<b>L1CAM (L1 9.3)</b>	*	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:1000/1:2000	1:100/-**
<b>NF-κB p65 (12H11)</b>	Millipore, Schwalbach, D	Maus/I gG <sub>1</sub>	1:500/1:2000	-
<b>Slug (G-18X)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Ziege/ polyklonal	1:500/1:2000	-
<b>Snail (E-18X)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Ziege/ polyklonal	1:500/1:2000	-
<b>Vimentin (V9)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	1:200/1:2000	1:50/-**

\* Generiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Gerd Moldenhauer, DKFZ Heidelberg

\*\* **EnVision + System-HRP anti mouse** (Dako) als Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>			
<b>Spezifität</b>	<b>Firma</b>	<b>Spezies</b>	<b>Konjugat</b>
<b>Maus-IgG</b>	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Pferd	HRP
<b>Maus-IgG</b>	Life Technologies, Darmstadt, D	Ziege	AlexaFluor488
<b>Kaninchen-IgG</b>	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Ziege	HRP
<b>Ziege-IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Esel	HRP

## 2.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

<b>Antikörper (Klon)</b>	<b>Firma</b>	<b>Spezies/ Isotyp</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>IgG<sub>1</sub> (MOPC-21)</b>	Biologend, Fell, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	FITC und PE	1:10 (Kontrolle zu Anti-CD68) oder 1:20 (Kontrolle zu Anti-CD163 oder 1:50 (Kontrolle zu Anti-CD16)
<b>IgG<sub>2a</sub> (MOPC-173)</b>	Biologend, Fell, D	Maus/ IgG <sub>2a</sub>	PE	1:50 (Kontrolle zu Anti-CD14) oder 1.50 (Kontrolle zu Anti-HLA-DR)
<b>IgG<sub>2b</sub> (MCA1125)</b>	AbD Serotec, Puchheim, D	Ratte/ IgG <sub>2b</sub>	PE	1:20 (Kontrolle zu Anti-CD11b)
<b>Anti-CD16 (3G8)</b>	Biologend, Fell, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	FITC	1:50
<b>Anti-CD68 (Y1/82A)</b>	Biologend, Fell, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	APC	1:10
<b>Anti-CD163 (RM3/1)</b>	Biologend, Fell, D	Maus/ IgG <sub>1</sub>	PE	1:20
<b>Anti-CD14 (Tük4)</b>	BD Bioscience, San Jose, USA	Maus/ IgG <sub>2a</sub>	PE	1:50
<b>Anti-CD11b (M1/70.15.11.5)</b>	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, D	Ratte/ IgG <sub>2b</sub>	PE	1:10
<b>Anti-HLA-DR (L243)</b>	Biologend, Fell, D	Maus/ IgG <sub>2a</sub>	FITC	1:20

## 2.7 Primer

Nachfolgende Primer wurden von der Firma Biometra (Göttingen, D) bezogen:

**CD163:** FW: ACTTGAAGACTCTGGATCTGCT  
RV: CTGGTGACAAAACAGGCACTG

**GAPDH:** FW: TCCATGACAACCTTTGGTATCGTGG  
RV: GACGCCTGCTTCACCACCTTCT

**IL-1 $\beta$ :** FW: AGTGCTCCTTCCAGGACCTGGA  
RV: CACTCTCCAGCTGTAGAGTGG

**IL-6:** FW: TTCTCCACAAGCGCCTTCGGT  
RV: GTCTCCTTTCTCAGGGCTGAG

**IL-10:** FW: AGAACAGCTGCACCCACTTC  
RV: CGCCTTGATGTCTGGGTCTT

**IL-12:** FW: TTATGATGGCCCTGTGGCCTTAG  
RV: AGGAAGCATTGAGATAGCTCATC

**TGF- $\beta$ 1:** FW: CCTGGCGATACCTCAGCAA  
RV: CCGGTGACATCAAAGATAACCA

**TNF- $\alpha$ :** FW: GAAAGCATGATCCGGGACGTGGA  
RV: GGCAGGGGCTCTTGATGGCAGA

**L1CAM:** FW: TCACGGGCAACAACAGCAACT  
RV: CGGCTTCCTGTCAATCATGCT

**E-Cadherin:** FW: TCTTCCCCGCCCTGCCAATC  
RV: GCCTCTCTCGAGTCCCCTAG

**Vimentin:** FW: TGGCACGTCTTGACCTTGAA  
RV: GGTCATCGTGATGCTGAGAA

**TBP:** FW: GCTGGCCCATAGTGATCTTT  
RV: CTTCACACGCCAAGAAACAG

**Slug:** FW: ATATTCGGACCCACACATTACCT  
RV: GCAAATGCTCTGTTGCAGTGA

**Snail:** FW: CTGCTCCACAAGCACCAACAGTC  
RV: CCAGCTGCCCTCCCTCCAC

Nachfolgende Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, D) bezogen:

**MMP-2:** FW:CACCCTGGAGCGAGGGTAC  
RV:CTGATTAGCTGTAGAGCTGAAGGC

**MMP-9:** FW:CATTTGACGATGACGAGTTGT  
RV: CGGGTGTAGAGTCTCTCGC

## **2.8 Oligonukleotide für EMSA-Assays**

*NF- $\kappa$ B Consensus Oligonucleotide* wurde von der Firma Promega (Heidelberg, D) bezogen:

5'-GATCGAGGGGACTTTCCCTAGC-3'

3'-CTAGCTCCCCTGAAAGGGATCG-5'

## 2.9 Rezepturen

Lösung	Rezeptur
<b>Blot-Puffer A</b>	300 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 11
<b>Blot-Puffer B</b>	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 10,6
<b>Blot-Puffer C</b>	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol 40 mM Aminocaprinsäure pH 10,6
<b>Blotto</b>	5 g Milchpulver 100 ml TBS-T (1x)
<b>EMSA I-Puffer</b>	10 mM HEPES (pH 7,9) 10 mM KCl 0,2 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin frisch zugesetzt
<b>EMSA II-Puffer</b>	20 mM HEPES (pH 7,9) 0,4 M KCl 0,2 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin frisch zugesetzt
<b>Kristallviolettlösung</b>	300 mg Kristallviolett 6 ml Ethanol 2 % (v/v) 300 ml Boratpuffer ( 0,1 M; pH 8,5)
<b>Lämmli-Puffer (2x)</b>	128 mM Tris-Base 4,6 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol pH 7,6

<b>MACS-Puffer</b>	0,5 g BSA 100 ml PBS
<b>Natives PAA Gel (5 %)</b>	2 ml 10 x TBE-Puffer 1250 µl Glycerol 80 % (v/v) 5 ml PAA 40 % (w/v) 300 µl APS 10 % (w/v) 30 µl TEMED ad 40 ml Aqua dest.
<b>TBE-Puffer (10x)</b>	89 mM Tris-Base 2 mM EDTA 89 mM Borsäure pH 7,6
<b>TBS (10x)</b>	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl pH 7,6
<b>TBS-Tween (TBS-T)</b>	100 ml TBS (10x) 1000 µl Tween 20 ad 1000 ml aqua dest.
<b>TE-Puffer</b>	1 mM EDTA 10 mM Tris HCL (pH 8,0)
<b>Westernblot Farbpuffer</b>	2,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,005 % (w/v) Bromphenolblau in 2 x Laemmli-Puffer
<b>Westernblot Sammelgel</b>	0,75 ml Aqua dest. 312,5 µl Tris-Puffer (pH 6,8) 162,5 µl Acrylamid 30 % (w/v) 6,75 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 1,25 µl TEMED
<b>Westernblot Trenngel (10 %)</b>	3 ml Aqua dest. 1,5 ml Tris-Puffer (pH 8,8) 1,5 ml Acrylamid 30 % (w/v) 22 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 4,4 µl TEMED



<b>Westernblot Trenngel (12 %)</b>	2,7 ml Aqua dest. 1,5 ml Tris-Puffer (pH 8,8) 1,8 ml Acrylamid 40 % (w/v) 22 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 4,4 µl TEMED
------------------------------------	--

## **3. Methoden**

### **3.1 Färbung von Paraffinschnitten**

#### **3.1.1 Immunhistochemische Färbung von CK PAN, $\alpha$ -SMA, Ki67, CD68, CD163 in Paraffinschnitten**

Schnitte von 42 PDAC-Präparaten mit einer Dicke von 5  $\mu$ m, eingebettet in Paraffin, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Christoph Röcken vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt.

Schnitte von 15 CP-Präparaten mit einer Dicke von 5  $\mu$ m, eingebettet in Paraffin, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bence Sipos vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchung der Gewebe sowie die Verwendung klinischer Daten wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein und des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (Ethikvotumnummer D430/09 und 470/210BO1).

Alle 57 Präparate wurden mit automatisierten Standardmethoden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gefärbt.

#### **3.1.2 Immunhistochemische Färbung von HLA-DR in Paraffinschnitten**

In allen 57 Präparaten (siehe **3.1.1**) wurde HLA-DR manuell via Peroxidasefärbung detektiert.

Die Schnitte wurden zunächst zweimal für 10 Minuten in Xylol entparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt. Dabei wurden sie zunächst zweimal 10 Minuten in 100 % Ethanol, dann 5 Minuten in 95 % Ethanol mit Zusatz von 0,3 % Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zum Blockieren endogener Peroxidasen inkubiert. Es folgten 2 Minuten Inkubation in 70 % und 2 Minuten in 50 % Ethanol sowie 2 Minuten in Aqua dest. Abschließend wurden die Schnitte 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der Erstantikörper (anti-HLA-DR, CR3/43, Zytomed) wurde in einer Verdünnung von 1:25 in 1 % BSA in PBS eingesetzt und die Schnitte damit 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Es wurde dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend 30 Minuten bei

Raumtemperatur in der Feuchtkammer mit EnVision + System-HRP *anti mouse* (Dako) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Substratreaktion mit AEC Substrat Chromogen (Dako) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit Aqua dest. gewaschen und die Kernfärbung mit Meyers Haemalaun für 5 Minuten durchgeführt. Nach 15 Minuten bläuen unter fließendem Wasser wurden die Präparate mit Glyceringelatine unter einem Deckgläschen versiegelt.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Zelllinien

Als Modell für prä malignes Pankreasgangepithel wurde die nicht tumorigene humane pankreatische duktaale Epithelzelllinie H6c7 verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Ming-Sound Tsao, Institut für Pathologie, Montreal General Hospital, Montreal, Kanada). Diese durch Transduktion der HPV-Onkoproteine E6/E7 immortalisierte Zelllinie [142] weist bis auf die Modulation der Rb- und p53-Signalwege durch die Onkoproteine einen Phänotyp von normalem Pankreasgangepithel auf, und zeigt keine der für das PDAC typischen Genmutationen wie z.B. KRAS2, SMAD4/DPC4 oder TP53 (siehe **Tabelle 1.1**).

Die maligne Pankreasgangepithelzelllinie Colo357 wurde als Modell für Karzinomzellen verwendet. Diese aus Lymphknotenmetastasen isolierte PDAC-Zelllinie, weist Mutationen in KRAS2 und SMAD4/DPC4 auf, zeigt aber den Wildtyp von TP53 und P16/CDKN2A [143]. Sie wurde von Prof. Dr. Holger Kalthoff, Institut für Experimentelle Tumorforschung, UKSH Campus Kiel, Kiel, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium H6c7: RPMI Medium und Keratinozytenmedium (1:1), supplementiert mit 0,5 % (v/v) L-Glutamin, 5 % (v/v) FCS, 5 ng/ml *Epidermal Growth Factor* (EGF) und 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt.

Kulturmedium Colo357: RPMI Medium, supplementiert mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (V/V) L-Glutamin und 1 % (v/v) Natriumpyruvat.

### **3.2.2 Kultivierung von Zelllinien**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank mit autoklavierten Materialien und sterilen Medien durchgeführt.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % und entsprechend ihrer Wachstumsrate geteilt. Dabei wurde das verbrauchte Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA in PBS versetzt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt, die Trypsinreaktion mit 5 ml Medium gestoppt und für 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert.

Es folgte eine Zellzahlbestimmung und Aussaat für die Versuchsreihen bzw. die Aufteilung der Zellsuspension auf zwei neue Kulturflaschen.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % rF kultiviert.

### **3.2.3 *In vitro*-Generierung von Makrophagen**

Monozyten aus peripherem Blut gesunder Spender wurden vom Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt, wobei eine schriftliche Einwilligung aller Spender vorlag. Dazu wurde zunächst die mononukleäre Zellfraktion per Dichtegradientenzentrifugation isoliert, welche dann mit einem JE-6B-Elutriator System (Beckmann Instruments Inc.) durch Gegenstromzentrifugation in Lymphozyten und Monozyten aufgetrennt wurde. Die angereicherten Monozyten wiesen Reinheiten um 95 % auf und wurden noch am selben Tag in den Differenzierungskulturen eingesetzt, die nach einem etablierten Protokoll durchgeführt wurden [61].

Dafür wurden Monozyten zu je  $15 \cdot 10^6$  Zellen in 27 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in Vue-Life-Teflonbeutel überführt und mit 50 ng/ml GM-CSF bzw. M-CSF versetzt. Die luftblasenfrei befüllten Beutel wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % rF inkubiert. Die Teflonbeschichtung und die Abwesenheit von Luft waren nötig, um andere Differenzierungsstimuli als die zugesetzten Wachstumsfaktoren möglichst gering zu halten. Nach 7 Tagen wurden die Beutel für eine Stunde auf Eis abgekühlt und die Zellen danach mechanisch durch Klopfen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, die Beutel mit 20 ml sterilem PBS nachgespült und die

entstandene Suspension ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden 10 Minuten bei 1400 UpM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Wenn mehr als ein Beutel einer Zellpopulation vorhanden war, wurden die Pellets vereinigt.

Es folgte eine Zellzahlbestimmung, dann wurden die Zellen für die Versuchsreihen bzw. für eine Charakterisierung weiter verwendet.

Die Teflonbeutel wurden 2 x mit 20 ml 70 % ETOH gespült, mit 20 ml 70 % ETOH befüllt und zur Wiederverwendung bei Raumtemperatur eingelagert.

### **3.2.4 Isolierung von humanen TAMs aus PDAC-Gewebe**

Frische Resektate von PDACs wurden von der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Kiel sowie von der Klinik für Allgemeine und Thorax-Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der Resektate und der klinischen Daten wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein genehmigt (Ethikvotumnummer D430/09). Das Gewebe wurde mit einem sterilen Skalpell in Stücke von ca. 1 mm<sup>3</sup> zerteilt und anschließend in 5 ml DMEM mit Zusatz von 5 mg/ml Kollagenase-I und 2 mg/ml Hyaluronidase bei 37°C unter leichtem Schwenken für ca. 2 Stunden verdaut. Die entstandene Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde dann in 10 ml *HANKs Balanced Salt Solution* mit Calcium resuspendiert und zunächst durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße, anschließend durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße filtriert. Der Durchfluss wurde wieder 10 Minuten bei 1400 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, resuspendiert, und bis zu  $2 \cdot 10^7$  Zellen mit CD11b-*MicroBeads* markiert. Markierte und nicht markierte Zellen wurden mit einer MACS-LS-Säule (Miltenyi) nach Herstellerprotokoll getrennt. Die CD11b-positiven Zellen wurden anschließend für FACS-Analyse, RNA-Isolation oder Mono- bzw. Co-Kulturen eingesetzt.

### 3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

In den Versuchsreihen wurden definierte Zellzahlen aller verwendeten Zelltypen eingesetzt. Dazu war eine Bestimmung der Zellzahl der initialen Zellsuspension notwendig. In einigen Versuchen wurde eine Zellzahlbestimmung bei Versuchsende durchgeführt.

Es wurden dazu 10 µl Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt, vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl in Zellen pro ml mit der nachfolgenden Formel berechnet.

Formel: Zellen in 4 Großquadraten / 4 =  $x \cdot 10^4$  Zellen pro ml

### 3.2.6 Co-Kultur von Epithelzellen und Makrophagen

Für die Versuchsreihen wurden die Epithelzellen in 12-Well-Kulturplatten ausgesät. Von den H6c7-Zellen wurden dafür  $1 \cdot 10^4$ , von den Colo357-Zellen  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well in 1 ml Kulturmedium eingesetzt. Nach einer Versuchsdauer von 5 Tagen wurden so aufgrund unterschiedlicher Proliferationsraten finale Zellzahlen von näherungsweise  $10 \cdot 10^4$  Zellen pro Well für beide Zelllinien erreicht. Dabei wurde eine Konfluenz von 90 % nicht überschritten.

Die *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen wurden in separaten Kulturplatten gleichen Formates in Transwell-Einsätzen mit 0,4 µm Porengröße in 1 ml Kulturmedium ausgesät. Es wurden dabei  $3 \cdot 10^5$  M1-Makrophagen und  $10 \cdot 10^5$  M2-Makrophagen pro 12-Well-Transwell eingesetzt. Aufgrund des unterschiedlichen Adhäsionsverhaltens der beiden Populationen waren am Ende der 5-tägigen Kulturdauer jeweils noch durchschnittlich  $10 \cdot 10^4$  Zellen vital, so dass in den Co-Kulturen zwischen Epithelzellen und Makrophagen ein Verhältnis von annähernd 1:1 bestand, was der *in vivo* Situation entsprechen sollte (siehe **Kapitel 4.2.3**).

Versuche mit isolierten TAMs wurden stets im 24-Well-Format durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Zellzahlen der Epithelzellen eingesetzt. Die Zahl der TAMs war von der isolierbaren Zellzahl abhängig und betrug zwischen  $1 \cdot 10^4$  und  $4 \cdot 10^4$  Zellen pro Transwell.

Bei allen Ansätzen wurden sowohl die Epithelzellen als auch die Makrophagen für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % rF kultiviert, um ein

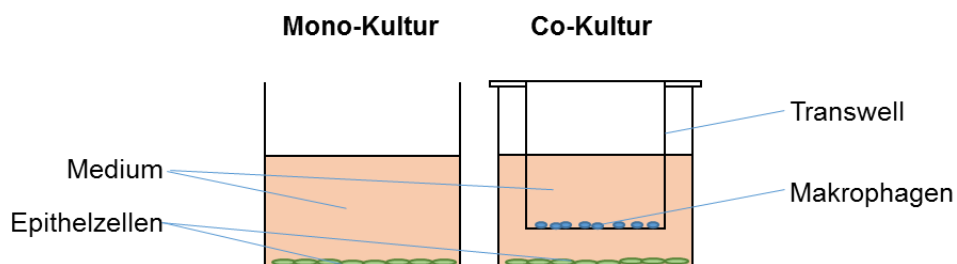
Anwachsen zu gewährleisten. Dann wurden die Makrophagen in den Transwells in die Kulturplatten mit den Epithelzellen im Well eingesetzt. Dabei wurde ein Mediumwechsel in Well und Transwell durchgeführt und jeweils 1 ml des jeweiligen Versuchsmediums (Gesamtmenge 2ml) eingesetzt.

-Kulturmedium H6c7: RPMI Medium, supplementiert mit 1 % (v/v) L-Glutamin, 5 % (v/v) FCS und 2,5 ng/ml EGF

-Kulturmedium Colo357: RPMI Medium, supplementiert mit 1 % (v/v) L-Glutamin und 10 % (v/v) FCS.

Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 3.1** schematisch dargestellt. In einigen Versuchen wurden den Versuchsmedien an dieser Stelle GM-CSF bzw. M-CSF in Konzentrationen von 50 ng/ml zugesetzt.

Das Zusammenfügen der Kulturen markierte den Startpunkt der Versuche und wurde als Tag 0 bezeichnet. Die Versuchsdauer von generell 5 Tagen wurde ab diesem Zeitpunkt gezählt.



**Abbildung 3.1: Typischer Versuchsaufbau einer Mono- und Co-Kultur aus Pankreasgangepithelzellen und Makrophagen**

Nach Ende der Mono- bzw. Co-Kultur wurden die Transwells mit einer sterilen Pinzette in eine neue Kulturplatte umgesetzt. So konnten Epithelzellen und Makrophagen getrennt aufgearbeitet werden.

### 3.2.7 Einsatz von Apoptosestimuli

In einigen Versuchen wurden der Apoptose induzierende Ligand TRAIL (Endkonzentration: 100 ng/ml), der agonistische FAS-Antikörper CH11 (100 ng/ml) oder die Zytostatika Etoposid (20 ng/ml) bzw. Gemzitabin (10 ng/ml) eingesetzt. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden vor Aufarbeitung der Zellen.

### 3.3 Charakterisierung von Makrophagen mittels Durchflusszytometrie

Für die Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden M1- und M2-Makrophagen wie unter 3.2.3 beschrieben *in vitro* generiert und TAMs aus Patientengewebe wie unter 3.2.4 beschrieben isoliert. Nach Bestimmung der Zellzahl (3.2.5) wurden mindestens  $1 \cdot 10^4$  Zellen pro Ansatz in 25 µl PBS in FACS-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4°C mit *FcR-Blocking-Reagent* inkubiert, danach mit 200 µl PBS gewaschen und bei 1200 UpM und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 25 µl Antikörperlösung (verdünnt in MACS-Puffer, Verdünnungsfaktor siehe 2.6.2) resuspendiert. Bei Mehrfachfärbungen wurden die Antikörper gleichzeitig inkubiert. Es wurden folgende Antikörper zur Charakterisierung verwendet:

Antikörper	Konjugat
IgG <sub>1</sub> (MOPC-21)	FITC und PE
IgG <sub>2a</sub> (MOPC-173)	PE
IgG <sub>2b</sub> (MOPC-11)	FITC und APC
IgG <sub>2b</sub> (MCA1125)	PE
Anti-CD16 (3G8)	FITC
Anti-CD68 (Y1/82A)	APC
Anti-CD163 (RM3/1)	PE
Anti-CD14 (HCD14)	PE
Anti-CD14 (Tük4)	PE
Anti-CD11b (M1/70.15.11.5)	PE
Anti-HLA-DR (L243)	FITC



Die Inkubation wurde im Dunkeln bei 4°C für 15 Minuten durchgeführt. Danach wurde mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen, 10 Minuten bei 1200 UpM und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 50 µl 1 %-iger Formaldehydlösung fixiert. Für die Detektion von intrazellulärem CD68 bei gleichzeitiger Färbung von Oberflächenproteinen wurde zunächst nicht fixiert, sondern nach dem ersten Waschgang die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Permeabilisierungs- und Fixierungslösung behandelt und mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (beide von eBioscience). Die Zellen wurden danach mit dem spezifischen CD68-Antikörper oder der Isotypenkontrolle für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Permeabilisierungspuffer wurde wie oben beschrieben fixiert. Die Durchflusszytometrie wurde mit einem FACS-Calibur (BD Bioscience), ausgestattet mit einem Argonlaser, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software WinMDI 2.8 (*Freeware*)

### **3.4 Protein- und RNA-Gewinnung aus Zelllysaten**

#### **3.4.1 Herstellung von Ganzzelllysaten**

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurden mono- bzw. co-kultivierte Zellen entweder direkt im Well bzw. Transwell oder nach Zellzählung im Eppendorfgefäß lysiert.

Bei der Aufarbeitung von Zellen in Kulturplatten wurde das Medium abgesaugt, mit 1 ml PBS gewaschen und Lämmli-Puffer (2x) zugesetzt. Das entstandene Lysat wurde mit einem Zellschaber bearbeitet und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zellen, die sich nach Zählung bereits im Eppendorfgefäß befanden, wurden 5 Minuten bei 1400 UpM zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde trocken gesaugt und mit Lämmli-Puffer (2x) versetzt. Die Menge an verwendetem Puffer wurde je nach Konfluenz der Zellen bzw. Pelletgröße angepasst und lag zwischen 50 und 150 µl. Das erhaltene Ganzzelllysate wurde mit einem *Sonicator* (Bandelin) mit 4 Impulsen von jeweils einer Sekunde behandelt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20°C

### **3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Proteinassay Dc (Biorad) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 680 nm im Photometer Tecan Sunrise (Tecan). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardreihe berechnet.

### **3.4.3 RNA-Isolierung**

Bei der Aufarbeitung von Zellen in Kulturplatten wurde das Medium abgesaugt, 2 x mit PBS gewaschen und die Zellen mit 300 µl des Lysepuffers T des PeqLab GoldKits (Peqlab) lysiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurde zunächst die in den Proben enthaltene DNA durch Bindung an eine Säule mit Silikafilter entfernt und die im Durchfluss nach Zentrifugation enthaltene RNA an eine weitere Silika-Säule gebunden. Nach zweimaligem Waschen wurde die Säule getrocknet, die RNA mit 40 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und in einem nukleasefreien Eppendorfgefäß aufgefangen. Isolierte RNA wurde mit einem Nanodrop Photometer (PeqLab) bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### **3.4.4 Kombinierte Protein- und RNA-Isolierung**

Bei geringen Mengen an Zellmaterial wurden RNA und Protein gleichzeitig mit dem NucleoSpin RNA/Protein Kit (Machery-Nagel) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Dabei wurde zunächst die in den Proben enthaltene DNA durch Bindung an eine Säule mit Silikafilter und Zentrifugation entfernt. Die im Durchfluss enthaltene RNA wurde an eine zweite Säule gebunden, das im Durchfluss enthaltene Protein zur späteren Aufarbeitung aufgehoben und auf Eis gestellt. Die Säule mit der gebundenen RNA wurde nach einem Entsalzungsschritt für 15 Minuten mit rDNase inkubiert, um Reste von DNA zu verdauen. Anschließend wurde zweimal gewaschen, getrocknet, die die RNA mit 40 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und in einem nukleasefreien Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C. Zur Aufarbeitung des Proteins folgte dann die Proteinpräzipitation mittels Präzipitationspuffers und Zentrifugation, eine Waschung, Trocknung und die Aufnahme des Proteinpellets in 50 – 150 µl Lämmli-Puffer (2x). Die Lagerung des Proteins erfolgte bei -20°C.

### **3.4.5 Herstellung von Kernextrakten**

Kernextrakte wurden für Westernblots und EMSA-Analysen benötigt. Dazu wurden Zellen wie unter **3.2.6** beschrieben für 5 Tage kultiviert.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 300 µl EMSA I-Puffer zugesetzt, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in ein gekühltes Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C und 1300 UpM für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde als zytosolische Proteinfraction bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in 300 µl EMSA I-Puffer resuspendiert, unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50 - 80 µl EMSA II-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 4°C auf einem Mikroplattenschüttler (Grant bio) geschüttelt und anschließend bei 4°C und 1300 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als Kernfraction bei -80°C gelagert und das Pellet verworfen.

### **3.5 cDNA Synthese**

Zur Synthese von cDNA wurde zunächst die gesamte RNA aus Zellen wie unter **3.4.3** bzw. **3.4.4** beschrieben isoliert.

Die cDNA wurde mit Reagenzien von Fermentas nach Anleitung des Herstellers aus bis zu 500 ng der isolierten RNA mittels reverser Transkription synthetisiert. Dabei wurden die Proben zunächst mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primern versetzt, um die Poly-A-Enden der RNA-Stränge für die Transkription durch die DNA-Polymerase zu markieren, und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 65°C im Tisch-Inkubator wurden die Proben mit einem Mastermix aus 4 µl Reaktionspuffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl RevertAid M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) versetzt und für eine Stunde bei 42°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Inkubation für 5 Minuten bei 70°C im Tisch-Inkubator abgestoppt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

### **3.6 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion**

Für die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*realtime polymerase-chain-reaction*, rtPCR) wurden bis zu 20 ng der zuvor synthetisierten cDNA pro Probe eingesetzt, mit nukleasefreiem Wasser auf 2,5 µl aufgefüllt und in einer weißen 96-Well PCR-Platte in Doppelbestimmung vorgelegt. Es wurden jeweils 7,5 µl des folgenden Mastermix zugegeben:

Mastermix pro Well:

5 µl Light Cycler Sybr Green I Master

0,0375 µl Vorwärtsprimer

0,0375 µl Rückwärtsprimer

2,425 µl nukleasefreies Wasser

Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie verschlossen, 2 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert und die PCR in einem Light Cycler 480 II (Roche) mit bis zu 60 Zyklen und anschließender Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software (Version 1.5) und Microsoft Excel (Microsoft). Dazu wurden als Normalisierungsreferenz TBP für Epithelzellen bzw. GAPDH für Makrophagen verwendet.

### **3.7 Westernblot**

#### **3.7.1 SDS-Protein-Gelelektrophorese**

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Ganzzelllysaten bzw. Kernextrakten wurden die Proben mit 2 x Lämmli-Puffer auf einen Proteingehalt von 5 – 15 µg in 20 - 40 µl eingestellt. Drei Teile Probe wurden dann mit 1 Teil Farbpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und anschließend auf das zuvor vorbereitete Polyacrylamidgel (10 oder 12 %) aufgeladen.

Die Auftrennung erfolgte bei 100 mV, bis die Lauffront durch das Sammelgel gelaufen war, und anschließend bei 140 mV, bis die Lauffront aus dem Trenngel ausgetreten war. Anschließend folgte der Transfer auf eine PVDF-Membran (siehe **3.7.2**)

### **3.7.2 Proteintransfer**

Für den Proteintransfer wurde ein Semidry-Blotverfahren mit folgendem Aufbau genutzt:

- Anode
- 6 Blätter Whatman-Papier, getränkt in Puffer A
- 3 Blätter Whatman-Papier, getränkt in Puffer B
- PVDF-Membran, 1 Minute gequollen in Methanol, gewaschen in Wasser
- Gel
- 6 Blätter Whatman-Papier, getränkt in Puffer C
- Kathode

Der Transfer erfolgte für 60 Minuten bei 70 mA für ein Whatman-Papierformat von 9 cm x 6,5 cm.

### **3.7.3 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern**

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und anschließend für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln in einem Schälchen in Blotto blockiert. Die spezifischen Primärantikörper wurden den Herstellerangaben entsprechend verdünnt in 5 ml des angegebenen Solvens in 50 ml Röhrchen vorgelegt und die Membran darin für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen und mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Der mit *Horseradish-Peroxidase* (HRP) gekoppelte Zweitantikörper war gegen den speziesspezifischen Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet und wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in Blotto eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Detektion erfolgte mit einer Fusion SL Chemilumineszenz-Geldokumentationsanlage (Peqlab) unter Verwendung des Clarity Western ECL Substrats (Bio-Rad) nach Herstelleranweisung. Für die Auswertung wurde die Fusion Capt Software 16.06 (Peqlab) sowie Microsoft Office (Microsoft) benutzt.

Als Ladekontrolle wurde für jeden Versuch stets HSP90 oder  $\beta$ -Aktin detektiert.

### **3.8 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)**

Der EMSA ist eine Methode zum Nachweis der spezifischen Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA. Dazu werden die Transkriptionsfaktoren per Kernextraktion aus Zellen gewonnen und mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die einem Teil der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor in einer DNA-Promotorsequenz entsprechen, inkubiert. Dieser Ansatz wird elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Liegt der Transkriptionsfaktor im Kern vor und kann an das Oligonukleotid binden, so wandert der Komplex langsamer im elektrischen Feld als das ungebundene Nukleotid und es wird eine Bande weiter oben auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Mit dieser Methode sollte in dieser Arbeit die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors *Nuclear Faktor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) in Kernextrakten von mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen detektiert werden. Verwendet wurde ein etabliertes und vielfach getestetes Oligonukleotid [144], so dass auf den Einsatz eines Kontrollnukleotids verzichtet wurde.

Zur Durchführung des EMSAs wurden Kernextrakte wie unter **3.4.5** beschrieben generiert und folgendem Bindungsansatz zugeführt. Alle Arbeiten erfolgten dabei an einem Radioaktivarbeitsplatz.

Bindungsansatz:	5 $\mu$ g	Kernextrakt
	2 $\mu$ l	5 x Bindungspuffer
	2 $\mu$ l	$^{32}$ P-markiertes Oligonukleotid (Promega)
	ad 10 $\mu$ l	Aqua dest.

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf das native PAA-Gel aufgeladen. Die Auftrennung erfolgte unter Kühlung bei 12 mA für 90 Minuten. Dann wurde das Gel auf ein Whatman-3MM-Filterpapier überführt und 2 Stunden bei 80°C vakuumgetrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein Röntgenfilm gelegt, welcher nach 7 Tagen mit einem Curix 60 Filmentwickler (Agfa) entwickelt wurde.

### **3.9 Immunzytochemie und Fluoreszenzfärbung**

Für alle immunzytochemischen und Fluoreszenzfärbungen wurden die Epithelzellen wie unter **3.2.6** beschrieben auf Deckgläschen ausgesät und 4 Tage mono- bzw. co-kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen.

#### **3.9.1 Immunzytochemische Färbung von L1CAM und Vimentin**

Die Zellen, die auf den Deckgläschen angewachsen waren, wurden zunächst mit 4,5 %-iger Paraformaldehydlösung für 15 Minuten fixiert, die Lösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurde mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetztes, eiskaltes Methanol auf die Zellen gegeben und 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend unspezifische Proteinbindungsstellen mit 4 % BSA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (L1CAM, Klon 9.3, 1:100 bzw. Vimentin, Klon V9, 1:50) wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer durchgeführt, die Deckgläschen dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit EnVision + System-HRP *anti mouse* (Dako) erneut in der Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Deckgläschen mit PBS wurde die Farbreaktion mit AEC Substrat Chromogen (Dako) für 2-10 Minuten, je nach Zelllinie und Antigen, entwickelt. Nach 3 weiteren Waschgängen von 5 Minuten mit PBS wurden die Deckgläschen 2 Minuten mit Mayers Haemalaun inkubiert und 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Das Eindeckeln der Deckgläschen erfolgte mit Glyceringelatine auf Objektträgern. Da es sich bei dieser Methode um ein etabliertes Protokoll handelt [111], wurde auf eine Isotypenkontrolle verzichtet. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss.

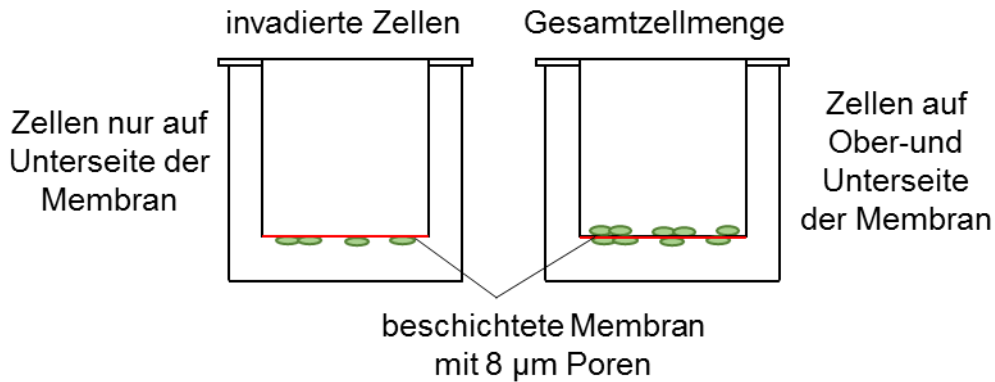
### 3.9.2 Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin

Die Zellen wurden zunächst mit 4,5 %-iger Paraformaldehydlösung für 15 Minuten fixiert, die Lösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Eiskaltes Methanol wurde in die Wells gegeben und für 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurde dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS, versetzt mit 0,3 % Triton-X (PBS/Triton) zur Permeabilisierung der Zellen, gewaschen und dann mit 4 % BSA in PBS/Triton für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine Feuchtkammer überführt und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (anti-E-Cadherin, Klon 32A8, 1:50 in 1 % BSA/Triton) inkubiert. Am nächsten Tag wurde wieder dreimal 5 Minuten mit PBS/Triton gewaschen und danach mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 *goat anti mouse*, 1:500) und dem Kernfarbstoff Hoechst33258 1:400 in 1 % BSA in PBS/Triton in der Feuchtkammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 4 Waschgänge für 5 Minuten mit PBS, dann wurde mit Fluor Save Reagent und Nagellack eingedeckelt. Da es sich bei dieser Methode um ein etabliertes Protokoll handelt [145], wurde auf eine Isotypenkontrolle verzichtet. Die Lagerung der Präparate erfolgte dunkel bei 4°C.

### 3.10 Invasionsassay mittels modifizierter Boyden-Kammer

Für die Messung der Zellinvasion, die durch eine Proteinmatrix hindurch stattfindet und darüber von der Migration abgegrenzt werden kann, werden Zellen in Matrix-beschichtete Transwell-Einsätze mit 8 µm Porengröße ausgesät, wobei die Aussaat in Doppelansätzen erfolgt. In jeweils einem der Doppelansätze werden die noch auf der Oberseite des Transwells befindlichen Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt, so dass sich nur noch die invadierten Zellen auf der Unterseite des Transwells befinden. In dem zweiten Ansatz verbleiben alle Zellen auf der Ober- und Unterseite. Anschließend werden die Zellen jedes Ansatzes mit Kristallviolett gefärbt, lysiert und die entstandene Farbstofflösung wird photometrisch vermessen. Aus dem Quotienten der Absorption des Lysats des mit dem Wattestäbchen gesäuberten Transwells (invadierte Zellen) und der Absorption des unbehandelten Ansatzes (Gesamtzellmenge) kann die Invasionsrate errechnet werden (**Abbildung 3.2**).





$$\% \text{ invadierte Zellen} = \text{inviadierte Zellen} * 100 \% / \text{Gesamtzellmenge}$$

**Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der Auswertung des Invasionsassays**

Zur Beschichtung der Transwells wurden in dieser Arbeit auf der Unterseite 50 µl einer Lösung von 400 µg/ml Kollagen I in Aqua dest. gleichmäßig verteilt und ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wurden Epithelzellen, die wie unter **3.2.6** beschrieben mono- bzw. co-kultiviert worden waren, zu  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 500 µl Medium (s.u.) in die Transwells ausgesät. In das Well darunter wurden ebenfalls 500 µl Medium eingefüllt. Als Versuchsmedium wurde RPMI-Medium mit 1 % L-Glutamin und 1 % FCS gewählt, um eine Proliferation der Zellen im Versuchszeitraum möglichst gering zu halten. Nach 24 Stunden im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt, die Transwells in eine saubere 24-Well Platte umgesetzt und jedes zweite Transwell eines Doppelansatzes mit einem Wattestäbchen auf der Oberseite gesäubert. Fünfhundert µl Kristallviolettlösung wurden pro Ansatz eingesetzt, 100 µl im Transwell und 400 µl im unteren Well. Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei Raumtemperatur wurde die Kristallviolettlösung vorsichtig abgesaugt. Die gefärbten Zellen wurden dreimal für 15 Minuten mit Aqua dest. gewaschen und anschließend mit 500 µl 10 %-iger Essigsäure für eine Stunde der Farbstoff in Lösung gebracht. Von der entstandenen Farbstofflösung wurden pro Ansatz je 100 µl in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 580 nm im Photometer gemessen. Die Invasionsrate wurde dann wie oben beschrieben berechnet.

### **3.11 TGF- $\beta$ 1 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay***

Zur Bestimmung der Konzentration von aktiviertem TGF- $\beta$ 1 mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurden Zellkulturüberstände der unter **3.2.6** beschrieben kultivierten Zellen abgenommen, 5 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert und bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Quantikine® Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay-Kit (R&D Systems), einem klassischen Sandwich-ELISA, nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurden die zu untersuchenden Proben und Kontrollen zunächst mit 1 N HCl angesäuert, um das enthaltene TGF- $\beta$ 1 zu aktivieren, und anschließend mit 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES neutralisiert. Dann wurden eine Standardverdünnungsreihe, Medium- und Negativkontrollen sowie die Proben in die Wells einer Mikrotiterplatte, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1 beschichtet war, pipettiert, um vorhandenes TGF- $\beta$ 1 quantitativ an den Antikörper zu binden. Nachdem alle ungebundenen Begleitsubstanzen durch Waschen entfernt worden waren, wurde mit einem Enzym-gekoppelten, polyklonalen Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1 inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde eine Substratlösung in die Wells gegeben, die bei Anwesenheit des Enzyms eine Farbentwicklung zeigte, die intensiver war, je mehr TGF- $\beta$ 1 in der jeweiligen Probe enthalten war. Die Mikrotiterplatte wurde in einem Photometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm, mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm vermessen. Anhand der Standardreihe konnten die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 [pg/ml] in den Analyten berechnet werden.

### **3.12 Bioplex-Analyse**

Das Bioplex-System ist ein Immunoassay, der das Prinzip des klassischen Sandwich-ELISAs mit dem der Durchflusszytometrie kombiniert, und mit dem theoretisch bis zu 100 Analyten aus einer einzigen Probe von 12,5  $\mu$ l detektiert werden können. Dazu werden Polystyrol-Beads benutzt, in die unterschiedliche Mischungen aus zwei Fluorochromen eingearbeitet wurden, und die darüber vom grünen Laser des Durchflusszytometers als 100 verschiedene Gruppen identifiziert werden können. Je nach gewünschtem Analyten können die *Bead*-Gruppen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet werden, welche den Analyten binden. Es folgt eine Inkubation mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper und anschließend mit

Streptavidin-Phycoerythrin. Das Phycoerythrin wird vom roten Laser des Durchflusszytometers erkannt. Somit ist eine gleichzeitige Identifikation über den grünen und eine Quantifizierung über den roten Laser möglich.

Für die Analyse wurden Zellkulturüberstände der unter **3.2.6** beschriebenen mono- bzw. co-kultivierten Zellen abgenommen, 5 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Als Kontrolle diente das jeweilige Versuchsmedium (siehe **3.2.6**). Die Methode wurde unter Verwendung eines Bio-Plex® Pro Assays (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Interleukine IL-4, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12p70, und IL-13, die Chemokine *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1/CCL2), *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ /CCL3), *macrophage inflammatory protein-1 $\beta$*  (MIP-1 $\beta$ /CCL4), *monokine induced by gamma interferon* (MIG/CXCL9) und *stromal cell derived factor-1 $\alpha$*  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) sowie *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, HGF und VEGF mit einem Bio-Plex® 200 Reader (Bio-Rad) untersucht und mit der Bio-Plex® Manager Software (Bio-Rad) ausgewertet.

### **3.13 Caspase-3/7-Aktivitätsassay**

Zur Messung der Aktivität der Effektorcaspasen-3 und -7 wurde der Caspase Glo® 3/7 Assay (Promega) durchgeführt. Dazu wurden Zellen zunächst wie unter **3.2.6** beschrieben kultiviert und mit Apoptosestimuli wie unter **3.2.7** beschrieben behandelt. Eine Kontrolle pro Ansatz blieb dabei stets unbehandelt. Nach der Behandlung mit den Stimuli wurde der Überstand jedes Ansatzes abgenommen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert, um sich darin befindliche, nicht mehr adhärente Zellen aus der Kultur zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand bis auf 1 ml (zum späteren Abstoppen der Trypsinreaktion) abgesaugt. Die noch adhären Epithelzellen wurden mit 1 ml Trypsin abgelöst und die entstandene Zellsuspension mit den zuvor zentrifugierten Zellen und dem 1 ml des Kulturüberstandes vereinigt. Es wurde erneut 5 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden von jedem Ansatz 25  $\mu$ l in Doppelbestimmung in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert und jeweils mit 25  $\mu$ l des

Caspase Glo-Reagenzes versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Chemilumineszenz im Mikroplattenluminometer (EG&G Berthold) gemessen. Zur Normalisierung der Ergebnisse auf die Zellmenge wurden die übrigen 450  $\mu$ l Zellsuspension als Ganzzelllysat aufgearbeitet und der Proteingehalt bestimmt (**3.4.1 und 3.4.2**). Zur Auswertung der Messdaten wurde die Caspase-Aktivität (Chemilumineszenzmessung) durch den Proteingehalt geteilt. Das Ergebnis jeder stimulierten Probe wurde als n-Faches der jeweiligen unstimulierten Referenz dargestellt.

In einigen Versuchen wurden die Lysate zusätzlich für die Analyse mittels Western-Blots genutzt (siehe **3.7**).

### **3.14 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 12.5 benutzt.

Auf normalverteilte Daten wurde die Varianzanalyse ANOVA angewandt, auf nicht normalverteilte Daten der Test nach Kruskal-Wallis. Einzelne Datenpaare wurden mit dem T-Test nach Student analysiert. P-Werte unter  $p = 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Detektion von Makrophagen in chronischen Pankreatitiden und PDACs

Der Zusammenhang der Präsenz von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) im duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC), insbesondere der von M2-Makrophagen, und der Lebenserwartung von PDAC-Patienten wurde bereits in der Literatur beschrieben [79]. Aufgrund unzureichender Charakterisierung der untersuchten TAMs über üblicherweise nur einen oder zwei M2-Phänotyp-assoziierte Marker [79,82,85] sowie einiger Hinweise auf die parallele Anwesenheit unterschiedlicher Makrophagenpopulationen bzw. gemischten Phänotypen in einigen Karzinomen [137–140], sollten in dieser Arbeit charakteristische Marker von M1- und M2-Makrophagen parallel in Resektaten von PDAC-Patienten analysiert werden. Dazu wurden zunächst 42 PDAC-Präparate immunhistochemisch auf den allgemeinen Makrophagenmarker CD68, den M2-spezifischen Marker CD163 und das M1-spezifische *human leucocyte antigen* (HLA)-DR sowie zusätzlich den Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA, den Proliferationsmarker Ki67 und den Epithelmarker Zytokeratin (CK-PAN) gefärbt.

Alle Präparate stammten von Patienten mit dem am häufigsten operierten Stadium des PDACs, T3N1M0. Dieses Stadium zeichnet sich nach dem TNM-System, durch eine Tumorausdehnung von mehr als 5 cm (T3) mit Lymphknotenbefall (N1) aber ohne Fernmetastasen (M0) aus. Die untersuchten Fälle unterschieden sich jedoch im Grading nach UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*), einem Maß für den Differenzierungsgrad der Tumorzellen, wobei 6 Fälle Grad 1 (G1 = gut differenziertes, malignes Gewebe), 23 Fälle Grad 2 (G2 = mäßig differenziertes, malignes Gewebe) und 13 Fälle Grad 3 (G3 = schlecht differenziertes, malignes Gewebe) aufwiesen. Grad 4 (G4 = nicht differenziertes, malignes Gewebe) lag in keinem der PDACs vor.

Um zu untersuchen, ob der Phänotyp und die Lokalisation von Makrophagen im PDAC unterschiedlich oder gleich zu denen in der chronischen Pankreatitis (CP) sind, die als eine Vorläufererkrankung des PDAC gesehen wird, wurden die oben genannten Färbungen und Auswertungen auch an 15 Präparaten von CPs durchgeführt. In **Tabelle 4.1** sind die Charakteristika der Patienten aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Charakteristika von CP- und PDAC-Patienten**

Parameter	Anzahl der Fälle
<b>CP Patienten</b>	15
<b>Median Alter (Spanne)</b>	52 (40-69)
<b>Geschlecht (männlich/weiblich)</b>	13/2
<b>PDAC-Patienten</b>	42
<b>Median Alter (Spanne)</b>	65 (46-85)
<b>Geschlecht (männlich/weiblich)</b>	24/18
<b>T Stage</b>	T3
<b>N Stage</b>	N1
<b>M Stage</b>	M0
<b>Tumor Grading</b>	
G1	6
G2	23
G3	13
G4	0

Zur Beurteilung der einzelnen Parameter wurde zunächst ein Scoring-System mit 5 Kategorien angewendet (**Tabelle 4.2**).

**Tabelle 4.2: Scoring-System für die Voreinteilung von Epithel- und Stroma-Markern in CP- und PDAC-Geweben**

Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5
negativ	<10 % positiv	10-50 % positiv	51-99 % positiv	100 % positiv

Dabei wurde der prozentuale Anteil positiver Zellen vom Gesamtstroma (CD68+, CD163+, HLA-DR+,  $\alpha$ -SMA+) oder – epithel (Ki67+) bzw. der Anteil stark gefärbter Zellen unter den positiven ( $\alpha$ -SMA<sup>hoch+</sup>) semi-quantitativ erhoben und den Scores zugeordnet. Daneben wurde auch die Lokalisation der Makrophagen im PDAC bzw. CP besonders berücksichtigt und beurteilt. Die CK-PAN-Färbung wurde benutzt, um die Epithel-/Tumorzellen zu identifizieren. Makrophagen wurden als epithelnah bezeichnet, wenn sie im Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung im Bildausschnitt noch neben den Epithel-/Tumorzellen zu sehen waren. Von jedem Präparat wurden

außerdem je 10 Aufnahmen desselben Bildausschnittes bei 400-facher Vergrößerung bei den Färbungen von CD68, CD163 und HLA-DR gemacht und die für CD68- und HLA-DR-positiven Makrophagen gezählt. Die Aufnahmen von CD163 wurden mit denen von CD68 verglichen und die Zahl von CD163+ Zellen als prozentualer Anteil der CD68+ Zellen abgeschätzt. Alle Auswertungen wurden im Kollektiv der PDACs auf das maligne Epithel und im Kollektiv der CPs vornehmlich auf PanIN-Läsionen bezogen. Die Auswertung der Makrophagenmarker CD68, CD163 und HLA-DR erfolgte auch unter Berücksichtigung der Morphologie der gefärbten Zellen. Auf diese Weise wurden Fibroblasten, welche ebenfalls CD68 und CD163 exprimieren können [146,147], bei der Auswertung ausgeschlossen.

Die entstandenen Gruppen wurden am Median dichotomisiert und so in zwei neue Gruppen von  $< Median$  (Score 1) und  $\geq Median$  (Score 2) aufgeteilt (**Tabelle 4.3**). Die nach dieser Rationale festgelegte Grenze zwischen den Gruppen unterschied sich dabei bei der Betrachtung von niedrig, mittel oder stark exprimierten Markern. Auswertungen der Lokalisation und numerischer Zellzählungen wurden mit diesem System nicht durchgeführt und erfolgten nach einem weiteren Scoring-System, welches in **Tabelle 4.4** dargestellt ist.

**Tabelle 4.3: Angepasstes Scoring-System für die Einteilung von Epithel- und Stroma-Markern in CP- und PDAC-Geweben**

Variable (bezogen auf)	Code	Score 1	Score 2
<b>Einteilung von Parametern niedriger Expression</b>			
HLA-DR+ (Stroma)	G	negativ	$\geq 1$ % positiv
<b>Einteilung von Parametern mittlerer Expression</b>			
CD68+ (Stroma)	A		
CD163+ (Stroma)	D	0-10 % positiv	11-100 % positiv
Ki67+ (Epithel-/Tumorzellen)	L		
<b>Einteilung von Parametern hoher Expression</b>			
$\alpha$ -SMA+ (Stroma)	J		
$\alpha$ -SMA <sup>hoch</sup> + ( $\alpha$ -SMA+)	K	nicht 100 % positiv	100 % positiv
CD163+ (CD68+) epithel-/tumornah	F		

**Tabelle 4.4: Scoring-System für die Auswertung der Lokalisation und numerischer Zellzählungen von Epithel- und Stroma-Markern in CP- und PDAC-Geweben**

Variable	Code	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
<b>Einteilung von Zellzählungen bei starker Vergrößerung</b>					
CD68+ epithel- /tumornah	C				
HLA-DR+ epithel- /tumornah	I	Zellzahl < Median	Zellzahl ≥ Median	-	-
<b>Bestimmung der Lokalisation</b>					
CD68+ Lokalisation	B				
CD163+ Lokalisation	E	epithel- /tumornah	im Stroma	gleichmäßig verteilt auf beide Kompartimente	nicht detektierbar
HLA-DR+ Lokalisation	H				

Die Färbung von CD68 in den PDAC-Präparaten ergab, dass in 21 der 42 Fälle der Anteil von Makrophagen am Stroma nicht mehr als 10 % betrug. In 19 Fällen betrug er jedoch über 10 %. In den CPs dagegen wiesen nur 4 von 15 Präparate einen Makrophagenanteil von unter 10 % des Stromas auf. In 11 Fällen war der Anteil höher als 10 %. Damit lag der Anteil von Präparaten mit hohem Makrophagenanteil in CPs bei 73 %, während er in den PDACs nur 45 % betrug. Die Färbung von CD163 erwies sich als zu fast 100 % deckungsgleich mit der von CD68 und entsprach daher der prozentualen Verteilung von CD68. Die Detektion von HLA-DR zeigte eine Abwesenheit von HLA-DR-positiven Makrophagen in 15 der 42 PDAC-Fälle. In 25 Fällen waren HLA-DR-positive Makrophagen zu detektieren. In den CPs wiesen hingegen nur 2 Präparate keine HLA-DR-positiven Zellen auf, in 13 Fällen war eine Detektion möglich. HLA-DR+ Zellen fanden sich also in 87 % der CP-Präparate, aber nur in 60 % der PDAC-Präparate. Eine Übersicht über die vergleichende Auswertung beider Gruppen findet sich in **Tabelle 4.5**.

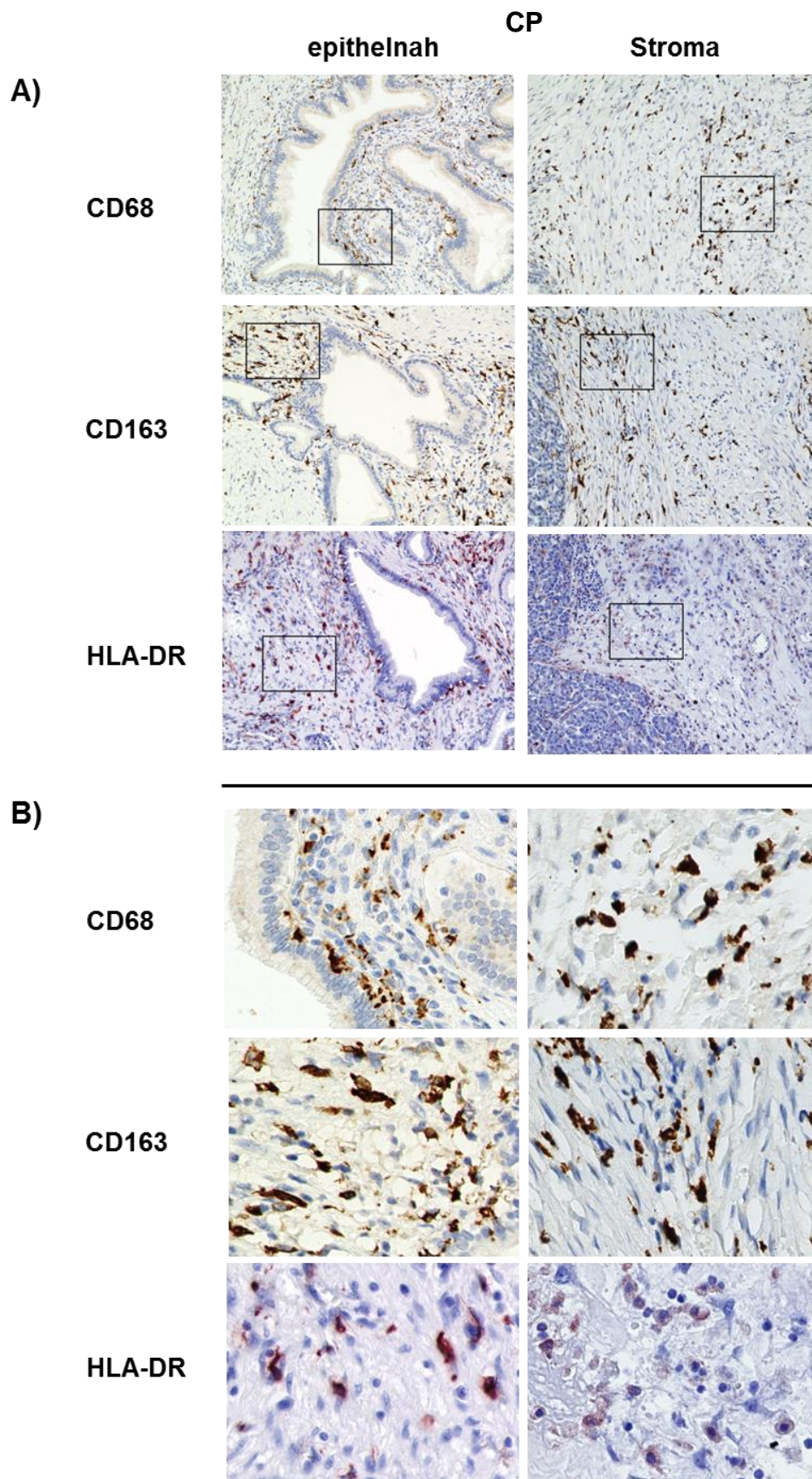


**Tabelle 4.5: Gruppenvergleich von epithelialen und Stroma-assoziierten Markern zwischen CP und PDAC.** Dargestellt sind die Fallzahlen der jeweiligen Scores (in Klammern). NA = nicht auswertbar.

Variable	CP (n=15)					PDAC (n=42)				
Stroma (bezogen auf)	Zahl der Fälle (Score)					Zahl der Fälle (Score)				
CD68+ (Stroma)	4(1)	11(2)				21(1)	19(2)			2(NA)
CD68+ Lokalisation	0(1)	7(2)	8(3)			22(1)	6(2)	13(3)		1(NA)
CD163+ (Stroma)	4(1)	11(2)				21(1)	20(2)			1(NA)
CD163+ Lokalisation	0(1)	7(2)	8(3)			22(1)	6(2)	13(3)		1(NA)
HLA-DR+ (Stroma)	2(1)	13(2)				15(1)	25(2)			2(NA)
HLA-DR+ Lokalisation	2(1)	4(2)	7(3)	2(4)		9(1)	5(2)	11(3)	15(4)	2(NA)
$\alpha$ -SMA+ (Stroma)	7(1)	6(2)			2(NA)	15(1)	26(2)			1(NA)
$\alpha$ -SMA <sup>hoch</sup> + ( $\alpha$ -SMA+)	10(1)	3(2)			2(NA)	23(1)	18(2)			1(NA)
<b>Epithel</b>										
Ki67+ (%)	11(1)	1(2)			3(NA)	9(1)	30(2)			3(NA)

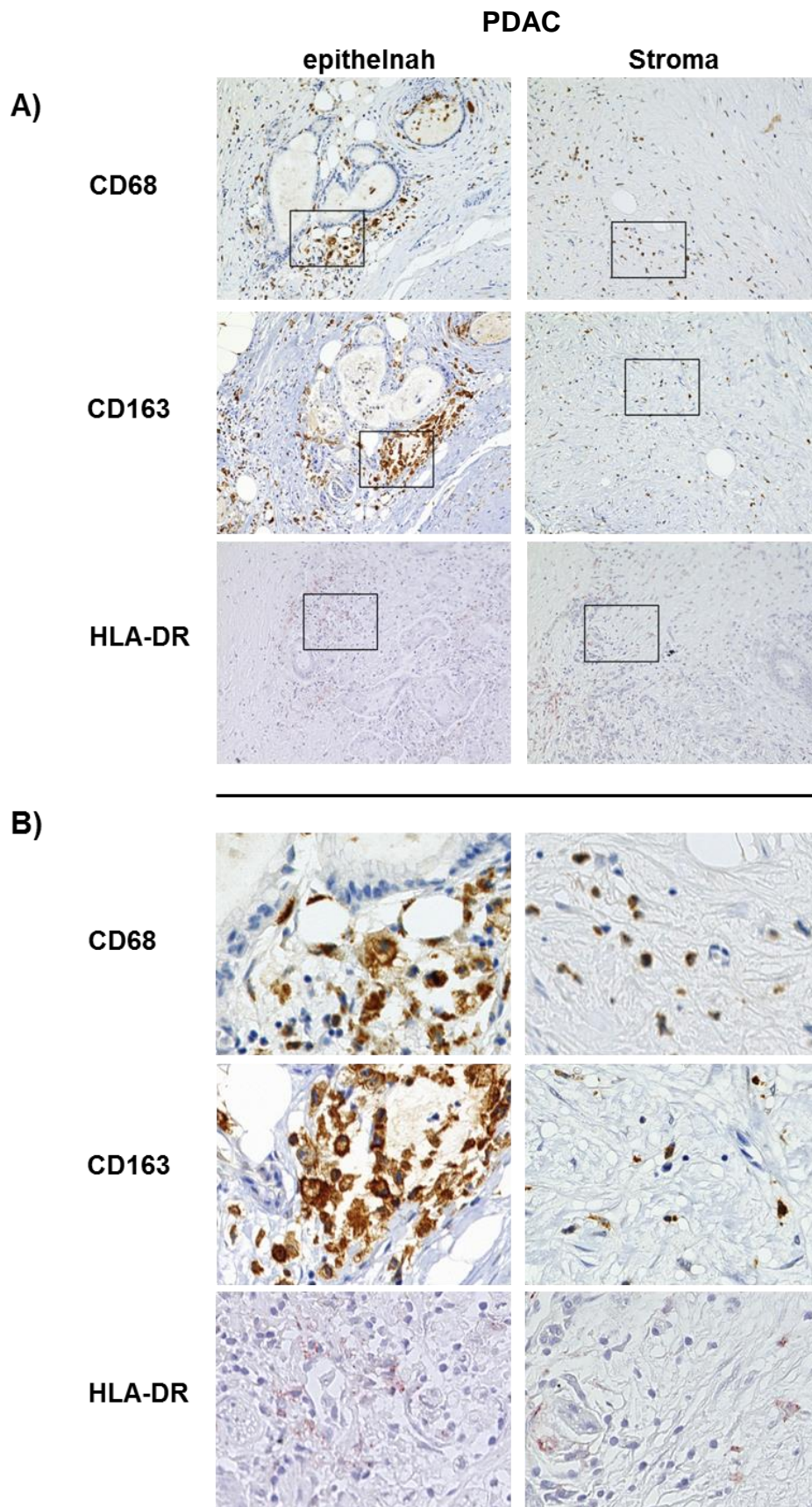
Die Lokalisation der CD68-positiven Makrophagen in den PDAC-Präparaten war in 22 der 42 Fälle in der Nähe des malignen Epithels erhöht. In 6 Fällen waren die Makrophagen gehäuft im Stroma zu detektieren und in 13 Fällen war die Verteilung gleichmäßig in beiden Kompartimenten. In den CP-Präparaten gab es hingegen keine vermehrte epithelnahe Lokalisation von CD68-positiven Zellen. In 7 Fällen war die Lokalisation verstärkt im Stroma zu sehen sowie in 8 Fällen gleichmäßig im Gewebe verteilt. Die Lokalisation von CD163 war in beiden Gruppen zu fast 100 % deckungsgleich mit CD68. In den PDACs waren HLA-DR-positive Makrophagen in 9 Fällen tumornah lokalisiert, in 5 Fällen vermehrt im Stroma und in 11 Fällen gleichmäßig in beiden Kompartimenten verteilt. In der CP-Gruppe waren die HLA-DR+ Makrophagen in 2 Fällen nahe dem Epithel verstärkt präsent, in 4 Fällen vermehrt im Stroma und in 7 Fällen gleichmäßig über das Gewebe verteilt. In beiden Gruppen konnte bei Abwesenheit von HLA-DR-positiven Zellen entsprechend deren Lokalisation nicht beurteilt werden (**Tabelle 4.5**). Die **Abbildungen 4.1** und **4.2** zeigen repräsentative Bildausschnitte der Lokalisation der Makrophagenpopulationen in

beiden Krankheitsgruppen mit der zuvor beschriebenen erhöhten Präsenz von CD68+, CD163+ und HLA-DR+ Makrophagen bei gleichmäßiger Verteilung in den Präparaten der CPs und ihre geringeren Zahl in den PDACs mit präferenzierter tumornaher Verteilung der CD68+ und CD163+ Makrophagen.



**Abbildung 4.1: Detektion von Makrophagenpopulationen in CP-Resektaten.** Repräsentative Färbungen von CD68, CD163 (beide braun) und HLA-DR (rot) in der Nähe des Pankreasgangepithels (epithelnah) und im Stroma (Stroma). Vergrößerung x200 (A) und x800 (B).





**Abbildung 4.2: Detektion von Makrophagenpopulationen in PDAC-Resektaten.** Repräsentative Färbungen von CD68, CD163 (beide braun) und HLA-DR (rot) in der Nähe von malignen Epithelstrukturen (epithelnah) und im Stroma (Stroma). Vergrößerung x200 (A) und x800 (B).

Obwohl keine Doppelfärbungen durchgeführt wurden, legen die Ergebnisse der CD163-Positivität vermutlich aller CD68-positiven Zellen, den Verdacht nahe, dass zumindest ein Teil davon CD163/HLA-DR-doppelpositiv ist.

Die Befunde der Makrophagenfärbungen wurden des Weiteren untereinander und mit den Ergebnissen zur Verteilung des Fibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA, des Proliferationsmarkers Ki67 und im Falle der PDACs mit dem Tumorgrading korreliert. Dazu wurden die erhobenen Scores in Kreuztabellen überführt und mittels Chi-Quadrat-Test auf signifikante Korrelationen, sowohl zwischen gleichen Markern beider Krankheitsgruppen (**Tabelle 4.6**), als auch zwischen den verschiedenen Markern innerhalb der Gruppen geprüft (**Tabelle.4.7** und **4.8**).

**Tabelle 4.6: Statistische Auswertung des Gruppenvergleichs von epithelialen und Stroma-assoziierten Markern zwischen CP und PDAC.** Dargestellt sind die p-Werte des Chi-Quadrat-Tests nach Auswertung der Kreuztabellen des Vergleichs von Markern in Stroma und Epithel-/Tumorzellen in Geweben von CPs und PDACs insgesamt (PDAC) und unterteilt in Gruppen von Geweben mit gut (G1), mäßig (G2) und schlecht differenzierten (G3) Tumorzellen

<b>Variable</b>	<b>CP vs PDAC</b>	<b>CP vs G1</b>	<b>CP vs G2</b>	<b>CP vs G3</b>
<b>Stroma (bezogen auf)</b>				
CD68+ (Stroma)	0,129	0,613	<b>0,045</b>	0,689
CD68+ Lokalisation	<b>&lt;0,01</b>	0,157	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,015</b>
CD163+ (Stroma)	0,134	0,613	0,052	0,689
CD163+ Lokalisation	<b>&lt;0,01</b>	0,157	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,015</b>
HLA-DR+ (Stroma)	0,109	1,000	0,273	<b>0,037</b>
HLA-DR+ Lokalisation	0,165	0,955	0,336	0,068
$\alpha$ -SMA+ (Stroma)	0,338	1,000	0,071	1,000
$\alpha$ -SMA <sup>hoch</sup> + ( $\alpha$ -SMA+)	0,211	0,268	0,468	0,411
<b>Epithel</b>				
Ki67+ (%)	<b>&lt;0,01</b>	0,191	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>

Durch die statistische Auswertung des Gruppenvergleichs (**Tabelle 4.6**) wurden die zuvor beschriebenen Unterschiede in der Makrophagenverteilung, nicht aber die Anzahl, als signifikant bestätigt. Die Lokalisation von CD68+ sowie CD163+ Zellen war in der PDAC-Gruppe signifikant häufiger nahe am Epithel als in der CP-Gruppe, in der die Verteilung gleichermaßen im Stroma konzentriert oder gleichmäßig im Gewebe

verteilt war. Außerdem war eine signifikante Erhöhung Ki67+ Epithelzellen in PDAC-Gewebe gegenüber CP-Gewebe zu erkennen.

Zur differenzierteren Betrachtung des PDAC-Kollektivs wurden drei nach Grading sortierte Gruppen gebildet. Es entstanden die Gruppen mit Grading G1 (n = 6), Grading G2 (n = 23) sowie Grading G3 (n = 13) und wurden jeweils hinsichtlich aller erhobenen Marker mit dem CP-Kollektiv verglichen (**Tabelle 4.6**). Die Verteilung der Scores in den Grading-Gruppen in Tabellenform, analog zu **Tabelle 4.5**, ist nicht gezeigt. Bei der Auswertung fiel auf, dass sich die CP-Gruppe in keinem der erhobenen Parameter signifikant von der G1-Gruppe unterschied. In der G2-Gruppe fanden sich im Vergleich zur CP-Gruppe hingegen signifikant häufiger Anteile von CD68+ Makrophagen unter 10 % der Stromazellen und CD68+ Makrophagen waren vermehrt epithel-/tumornah lokalisiert. Letzteres galt auch für CD163+ Makrophagen. Außerdem waren in der G2-Gruppe signifikant höhere Anteile von Ki67+ Tumorzellen zu detektieren als Ki67+ Epithelzellen in der CP-Gruppe. In der G3 Gruppe war die Lokalisation der CD68+ sowie der CD163+ Makrophagen ebenfalls öfter epithel-/tumornah als in der CP-Gruppe. Diese wies des Weiteren signifikant höhere Anteile von HLA-DR+ Makrophagen und niedrigere Anteile Ki67+ Zellen als die G3-Gruppe auf. Insgesamt lässt sich aus diesen Beobachtungen ein Trend ableiten, der zunehmende Unterschiede in Stroma und Epithel-/Tumorzellen zwischen CPs und PDACs mit steigendem Tumor-Grading anzeigt.

Bei der Korrelation innerhalb der Gruppen (**Tabelle 4.7**) ergab sich im Kollektiv der CP-Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohen Anteilen von CD68+ und CD163+ Zellen (Codes A und D in **Tabelle 4.7**) und deren gleichmäßiger bzw. bevorzugter Lokalisation (D, E) im Stroma. Letzteres galt auch für HLA-DR+ Zellen (H), welche in chronischen Pankreatitiden ebenfalls keine präferentielle Verteilung zeigten, wobei die Lokalisation bei hohen prozentualen Anteilen von HLA-DR+ Zellen (G) vermehrt epithelnah war (H, I).

Im Falle eines niedrigen Anteils von Fibroblasten (J) waren CD68+ und CD163+ Zellen tendenziell vermehrt in Stroma und nicht epithelnah zu detektieren.

**Tabelle 4.7: Korrelation von Makrophagenmarkern,  $\alpha$ -SMA und Ki67 in CP-Resektaten.** Dargestellt sind die p-Werte des Chi-Quadrat-Tests nach Auswertung der Scores mit Hilfe von Kreuztabellen. nm = nicht möglich (ein Parameter ist eine Konstante), ns = nicht signifikant

Variable	Code	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CD68+/Stroma	A	X	ns	ns	<b>0,001</b>	ns	nm	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD68+ Lokalisation	B		X	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	nm	ns	<b>0,005</b>	ns	<b>0,007</b>	ns	ns
CD68+ epithelnah	C			X	ns	ns	nm	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD163+/Stroma	D				X	ns	nm	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD163+ Lokalisation	E					X	nm	ns	<b>0,005</b>	ns	<b>0,007</b>	ns	ns
CD163+ epithelnah	F						X	nm	nm	nm	nm	nm	nm
HLA-DR+/Stroma	G							X	<b>0,002</b>	<b>0,011</b>	ns	ns	ns
HLA-DR+ Lokalisation	H								X	<b>0,003</b>	ns	ns	ns
HLA-DR+ epithelnah	I									X	ns	ns	ns
$\alpha$ -SMA+/Stroma	J										X	ns	ns
$\alpha$ -SMA <sup>hoch+</sup> / $\alpha$ -SMA+	K											X	ns
Ki67+ (%)	L												X

Im Kollektiv der PDAC-Patienten ergaben sich folgende signifikante Zusammenhänge (**Tabelle 4.8**). Ein hoher Anteil CD68+ Zellen im Stroma (Code A in **Tabelle 4.8**) und deren Lokalisation nahe den Tumorzellen (B) korrelierten mit denen der CD163+ Zellen (D, E). Ferner ging eine tumornahe Verteilung von CD68+ und CD163+ Zellen mit einer hohen Zahl von Myofibroblasten (K) einher und ein geringer Anteil von Fibroblasten am Stroma (J) korrelierte mit einer vermehrten Expression von Ki67 im Epithel (L).

Tendenziell deutete sich an, dass bei niedrigen Anteilen von CD68+ Zellen (A) diese vermehrt nahe dem Tumor lokalisiert waren (B) ebenso wie die CD163+ Zellen (E). Außerdem zeigten CD68+ Zellen bei geringer Zahl und tumornaher Lokalisation (B, C) tendenziell wenig HLA-DR-Expression (I), wobei HLA-DR+ Zellen bei hohen epithelnahen Anteilen von CD68+ und CD163+ Zellen (B, C, E) gleichmäßig verteilt

waren (H). Eine tumornahe Verteilung von CD68+ und CD163+ Zellen tendierte zur Korrelation mit einem höheren Tumorgrading.

**Tabelle 4.8: Korrelation von Makrophagenmarkern,  $\alpha$ -SMA, Ki67 und Grading in PDAC-Resektaten.** Dargestellt sind die p-Werte des Chi-Quadrat-Tests nach Auswertung der Scores mit Hilfe von Kreuztabellen. nm = nicht möglich (ein Parameter ist eine Konstante), ns = nicht signifikant

Variable	Code	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
CD68+/Stroma	A	X	0,083	ns	<0,01	0,083	nm	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD68+ Lokalisation	B		X	ns	ns	0,000	nm	ns	0,009	ns	ns	0,027	ns	0,009
CD68+ epithelnah	C			X	ns	ns	nm	ns	0,007	0,008	ns	0,007	ns	ns
CD163+/Stroma	D				X	ns	nm	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD163+ Lokalisation	E					X	nm	ns	0,009	ns	ns	0,027	ns	0,009
CD163+ epithelnah	F						X	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
HLA-DR+/Stroma	G							X	<0,01	<0,01	ns	ns	ns	ns
HLA-DR+ Lokalisation	H								X	<0,01	ns	ns	ns	ns
HLA-DR+ epithelnah	I									X	ns	ns	ns	ns
$\alpha$ -SMA+/Stroma	J										X	ns	0,026	ns
$\alpha$ -SMA <sup>hoch</sup> +/ $\alpha$ -SMA+	K											X	ns	ns
Ki67+ (%)	L												X	ns
Grading	M													X

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse von **Kapitel 4.1** darauf hin, dass eine strikte Einteilung der TAMs im PDAC in polarisierte M1- und M2-Makrophagen unzureichend ist, da sich vielmehr ein gemischter Phänotyp von sowohl CD163+ (M2-) als auch HLA-DR+ (M1-) Makrophagen andeutet. Aufgrund der bevorzugten Lokalisation dieser Zellen nahe dem Epithel, aber nur sehr selten in direktem Zell-Zell-Kontakt mit diesem, scheinen diese eher einen Einfluss über lösliche Faktoren auf die Epithelzellen auszuüben. Interessanterweise zeigt sich dieser Mischphänotyp bereits in chronischen



Pankreatitiden, wobei dort der Anteil an M1-polarisierten Zellen noch mehr Gewicht zu haben scheint und die Makrophagen sich weniger epithelnah konzentrieren.

Um zu untersuchen, ob TAMs aus PDACs tatsächlich einen gemischten M1-/M2-Phänotyp aufweisen und welchen Einfluss diese Zellen hinsichtlich EMT auf Pankreasgangepithelzellen haben, wurden TAMs von PDAC-Patienten isoliert und sowohl phänotypisch als auch funktionell charakterisiert. Um zu bestimmen über welche Eigenschaften (pro- oder anti-inflammatorisch) Makrophagen zur EMT und anderen Malignitäts-assoziierten Veränderungen beitragen, wurden *in vitro* generierte M1- und M2-Makrophagen parallel charakterisiert. Zur Untersuchung des Einflusses der drei Makrophagenpopulationen auf Pankreasgangepithelzellen wurde ein indirektes Co-Kultursystem herangezogen, um speziell den Effekt löslicher Faktoren dabei zu berücksichtigen.

## 4.2 Der Einfluss von TAMs und *in vitro* generierten Makrophagen auf die EMT und Invasionsfähigkeit von prämaligen und malignen Pankreasgangepithelzelllinien

### 4.2.1 Charakterisierung von isolierten PDAC assoziierten Makrophagen und *in vitro* generierten Makrophagen

Bevor der Einfluss von TAMs auf Pankreasgangepithelzellen mit dem von M1- bzw. M2-Makrophagen vergleichend untersucht werden sollte, erfolgte zunächst eine umfangreiche Charakterisierung der TAMs im Vergleich zu *in vitro* polarisierten M1- und M2-Makrophagen. Dazu wurden TAMs aus frisch resezierten PDAC-Geweben durch magnetische Bead-Separation über CD11b isoliert und vergleichend mit den beiden *in vitro* generierten Makrophagenpopulationen per Durchflusszytometrie und rtPCR analysiert.

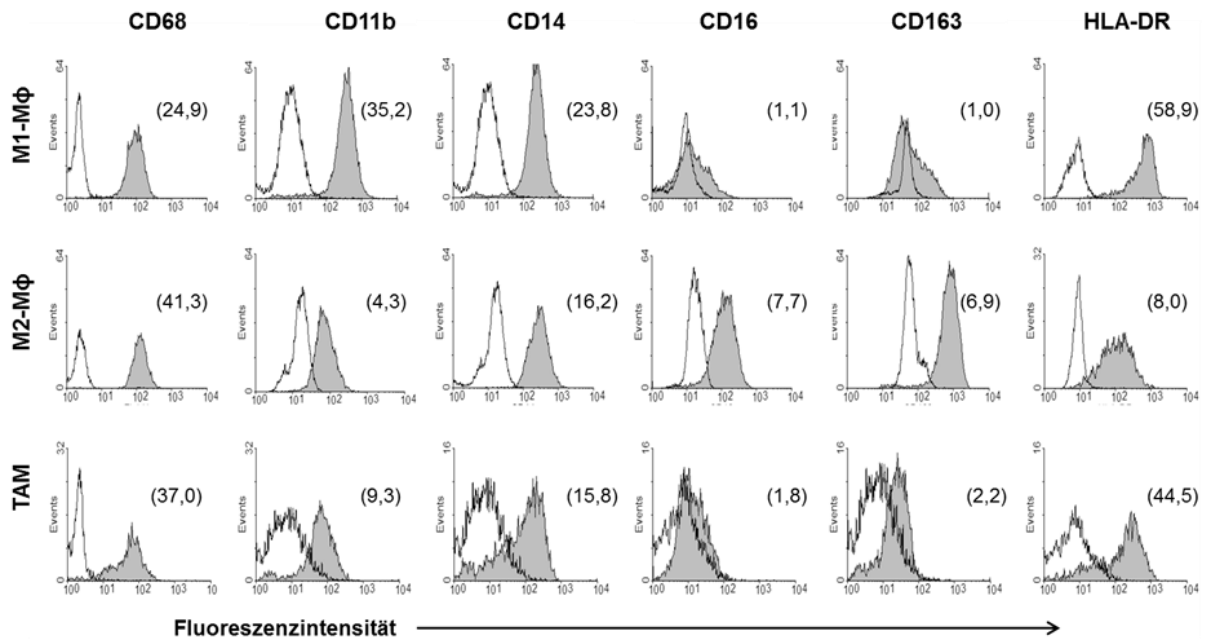
Die durchflusszytometrische Analyse isolierter TAMs von 10 PDAC-Patienten ergab, dass durchschnittlich mehr als 70 % der monozytären Zellen, die durch ihr Streulichtprofil definiert wurden, doppelpositiv für CD11b und den Makrophagenmarker CD68 (im Mittel 71,3 %) sowie CD14 und CD68 (im Mittel 70,6 %) waren und somit als Makrophagen definiert werden konnten. Durchschnittlich 84,5 % dieser CD68+ Zellen exprimierten HLA-DR, wobei das Expressionsniveau (Ratio der mittleren Fluoreszenzintensität, MFI 52,4) über dem der *in vitro* generierten M1- (MFI 47,9) und dem der M2-Makrophagen (MFI 29,4) lag. Die M2-Makrophagenmarker CD16 und CD163 wurden in 8,7 % bzw. 22,1 % der TAMs erhöht exprimiert, wobei CD16 auf 70,9 % der M2- und 30 % der M1-Makrophagen, CD163 auf 36,4 % der M2- und 16,5 % der M1-Makrophagen gefunden wurde. Die Expression von CD16 lag auf TAMs also unter, die von CD163 zwischen den Expressionsraten der beiden *in vitro* generierten Makrophagenpopulationen. Außerdem zeigten durchschnittlich 23,2 % der TAMs eine hohe Expression von sowohl CD163 als auch HLA-DR, was auf einen gemischten Phänotyp von M1- und M2-Eigenschaften hinweist. Die Mittelwerte der Expression der untersuchten Marker in TAMs sind in **Tabelle 4.9**, die in M1- und M2-Makrophagen in **Tabelle 4.10** zusammengefasst, wobei die Phänotypen letzterer im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe stehen, die das Differenzierungsprotokoll etablierte [61]. **Abbildung 4.3** zeigt ein repräsentatives Experiment der vergleichenden Charakterisierung von M1- und M2-Makrophagen mit TAMs mittels Durchflusszytometrie.

**Tabelle 4.9: Mittelwerte der durchflusszytometrischen Analyse frisch isolierter TAMs von PDAC-Patienten.** Angegeben sind MFI-Raten (MFI des spezifischen Antikörpers / MFI des Kontrollantikörpers) und % positiver Zellen für jeden Marker aus 10 unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Streuung der Einzelwerte in Klammern.

Marker	TAMs	
	MFI	% positive Zellen
<b>CD11b+CD68+</b>	<b>7,5</b> (1,3-14,8)	<b>71,3</b> (37,6-90,6)
<b>CD14+CD68+</b>	<b>11,1</b> (1,7-28,1)	<b>70,6</b> (49,4-85,0)
<b>CD16+CD68+</b>	<b>1,3</b> (0,4-2,9)	<b>8,7</b> (0,8-28,5)
<b>CD163+CD68+</b>	<b>1,3</b> (0,4-2,8)	<b>22,1</b> (4,6-41,8)
<b>HLA-DR+CD68+</b>	<b>52,4</b> (8,9-115,6)	<b>84,5</b> (60,4-94,6)
<b>CD163+HLA-DR+CD68+</b>		<b>23,2</b> (7,1-44,2)

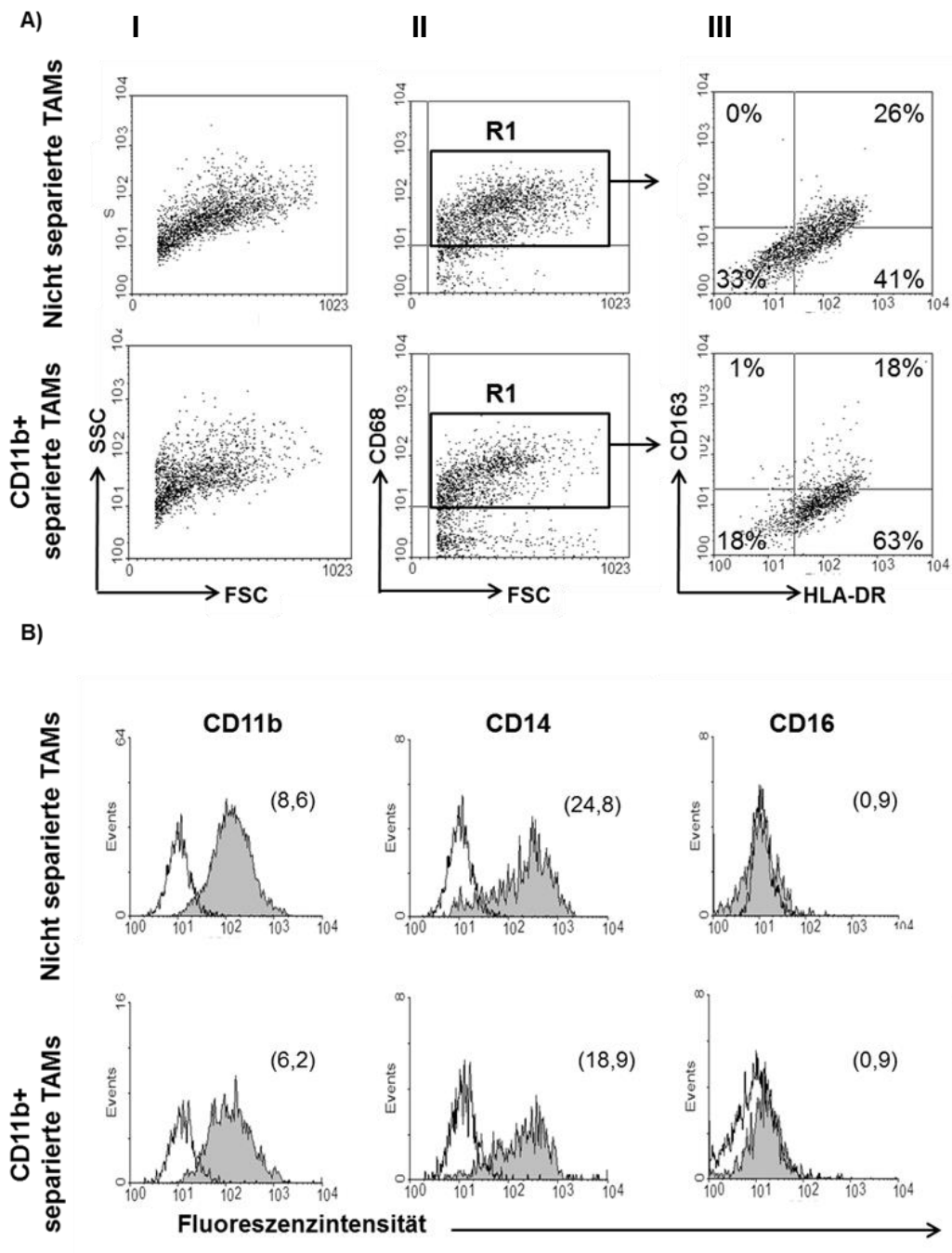
**Tabelle 4.10: Mittelwerte der durchflusszytometrischen Charakterisierung von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen.** Angegeben sind MFI-Raten (MFI des spezifischen Antikörpers / MFI des Kontrollantikörpers) und % positiver Zellen für jeden Marker aus 10 unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Streuung der Einzelwerte in Klammern.

Marker	M1		M2	
	MFI-Rate	% positive Zellen	MFI-Rate	% positive Zellen
<b>CD68+</b>	<b>19,6</b> (5,1-63,5)	<b>90,3</b> (72,2-97,3)	<b>62,8</b> (2,7-296,7)	<b>91,8</b> (77,2-98,9)
<b>CD11b+</b>	<b>20,0</b> (3,1-37,5)	<b>83,6</b> (72,6-96,2)	<b>5,1</b> (0,6-13,7)	<b>54,6</b> (20,5-81,8)
<b>CD14+</b>	<b>22,1</b> (1,5-67,9)	<b>76,4</b> (51,7-94,5)	<b>18,3</b> (9,5-30,2)	<b>83,5</b> (32,2-98,1)
<b>CD16+</b>	<b>3,1</b> (1,0-4,6)	<b>30,3</b> (4,7-61,3)	<b>10,6</b> (1,6-28,4)	<b>70,9</b> (21,8-92,6)
<b>CD163+</b>	<b>2,0</b> (0,3-6,7)	<b>16,5</b> (0-65,7)	<b>6,5</b> (0,4-26,2)	<b>36,4</b> (0-92,5)
<b>HLA-DR+</b>	<b>47,9</b> (8,3-119,7)	<b>91,3</b> (72,2-98,2)	<b>29,4</b> (3,1-161,1)	<b>80,6</b> (48,2-95,8)



**Abbildung 4.3: Durchflusszytometrische Charakterisierung von TAMs aus PDAC-Geweben im Vergleich zu *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen.** Durchflusszytometrische Analyse von M1- und M2-Makrophagen sowie TAMs auf die aufgeführten Marker. Die Zahlen in Klammern geben den Median der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des spezifischen Antikörpers an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 10. Leeres Histogramm = Isotypenkontrolle, graues Histogramm = spezifischer Antikörper.

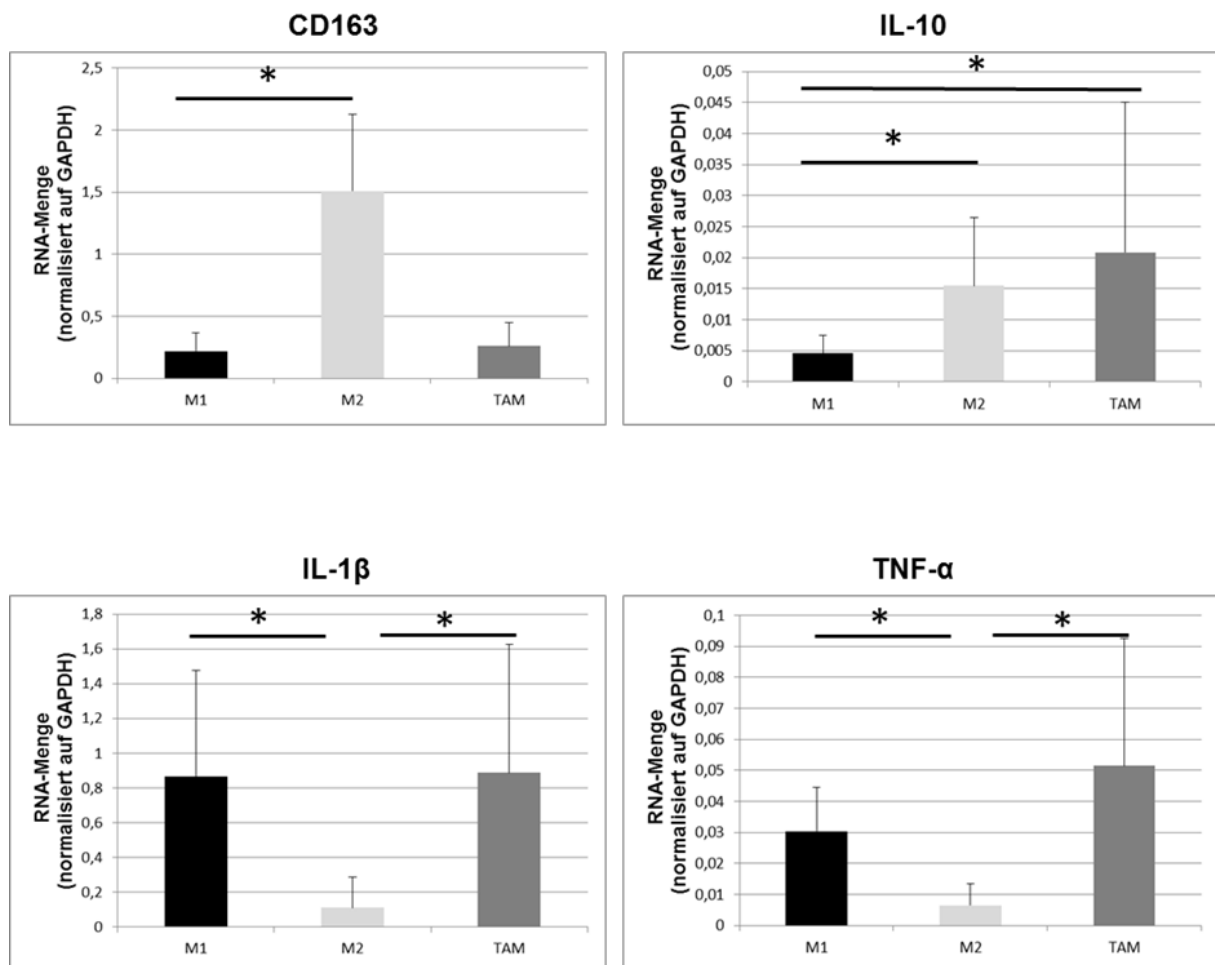
Um sicherzugehen, dass die isolierten TAMs phänotypisch repräsentativ für die Gesamtpopulation im Tumor waren, wurde auch überprüft, ob die magnetische Bead-Separation über CD11b einen Einfluss auf die Zusammensetzung der TAM-Fraktion hatte. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen von PDAC-Geweben vor und nach magnetischer Bead-Separation vergleichend mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer phänotypischen Zusammensetzung, speziell der Anteile von CD163/HLA-DR-doppelpositiven sowie CD11b+, CD14+ und CD16+ Zellen in der Fraktion der CD68+ Zellen untersucht. Wie in **Abbildung 4.4 A und B** gezeigt, gab es kaum einen Einfluss auf den Anteil von CD163+/HLA-DR+ Zellen (26 % in nicht separierter und 18 % in separierter TAM-Fraktion) sowie auf die Anteile von CD11b+, CD14+ und CD16+ Zellen bezogen auf die CD68-positiven Zellen. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp der TAM-Population durch die Auftrennung nicht wesentlich verändert wurde.



**Abbildung 4.4: Magnetische Bead-Separation verändert nicht den Phänotyp der TAM-Population.**

Durchflusszytometrische Analyse von TAMs aus PDAC-Gewebe in einer Einzelzellsuspension vor (nicht separierte TAMs) und nach CD11b vermittelter magnetischer Bead-Separation (CD11b+ separierte TAMs). **A)** Gezeigt sind repräsentative Dot Plots von FSC (*Forward Side Scatter*) gegen SSC (*Side Scatter*; I) und FSC gegen CD68+ Zellen (II). Anhand der Größe und Positivität für CD68 wurden diese Zellen gated (R1) und hinsichtlich der Co-Expression von CD163 und HLA-DR untersucht (III). **B)** Gezeigt sind repräsentative Histogramme der Färbungen von CD11b, CD14 und CD16 in CD68 in den beiden Zellpopulationen mit angegebener MFI in Klammern. Leeres Histogramm = Isotypenkontrolle, graues Histogramm = spezifischer Antikörper.

Trotz einiger Variationen im Profil der monozytären Zellen in verschiedenen TAM-Präparationen konnten ähnliche Ergebnisse in den 10 untersuchten Spendern gefunden werden, wie in **Tabelle 4.9** zusammengefasst. Um die TAMs weiter zu charakterisieren, wurde ihre RNA auf die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Effektoren mittels rtPCR untersucht und mit der Expression in M1- und M2-polarisierten Makrophagen verglichen. Die M2-Marker CD163 und IL-10 sowie die pro-inflammatorischen M1-Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurden dafür untersucht. (**Abbildung 4.5**).



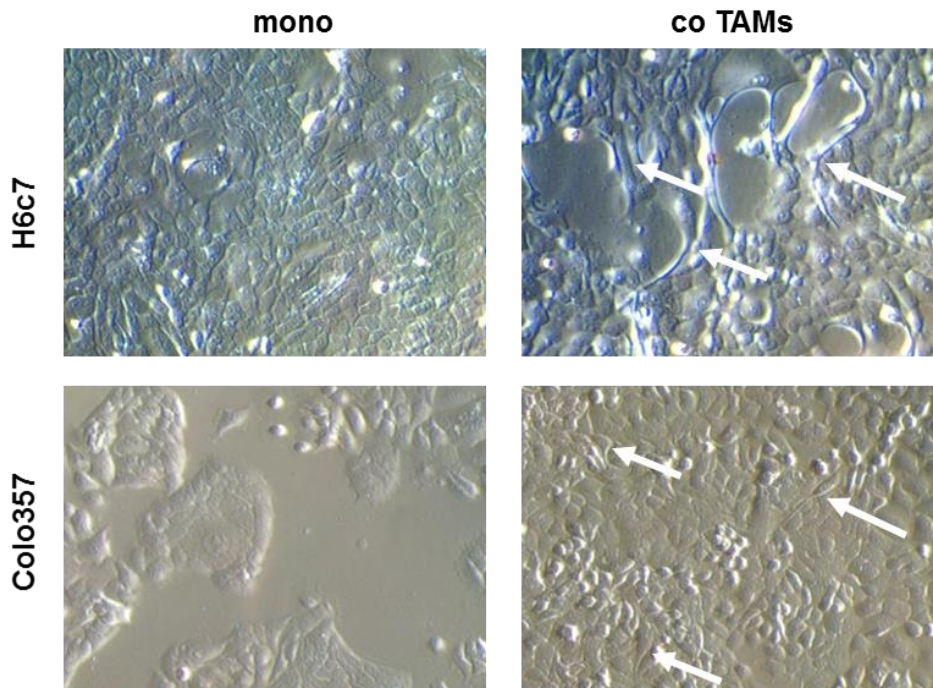
**Abbildung 4.5: Charakterisierung von M1-Makrophagen, M2-Makrophagen und TAMs mittels rtPCR.** Analysiert wurde die Expression von CD163, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und GAPDH mittels rtPCR. Angegeben sind relative Einheiten normalisiert auf GAPDH als Mittelwert  $\pm$ Standardabweichung (SA) von 9 unabhängigen Experimenten. \* = p < 0,05

Wie zu erwarten zeigten *in vitro* generierte M2-Makrophagen höhere RNA-Mengen von CD163 und IL10 und niedrigere von IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  verglichen mit M1-Makrophagen. TAMs aus PDAC-Geweben zeigten dagegen sowohl erhöhte Expressionen von IL-10 und CD163, wobei letztere nicht so hoch wie in M2-Makrophagen waren, als auch eine Erhöhung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , ähnlich wie sie in den *in vitro* generierten M1-Makrophagen zu detektieren war.

Unterstützt durch die Ergebnisse der rtPCR weisen diese Daten insgesamt auf einen gemischten Phänotyp der TAMs mit Eigenschaften von sowohl M1- als auch M2-Makrophagen hin und untermauern damit die Befunde der immunhistochemischen Färbungen (siehe **Kapitel 4.1**).

#### 4.2.2 PDAC assoziierte Makrophagen induzieren EMT in H6c7- und Colo357-Zellen

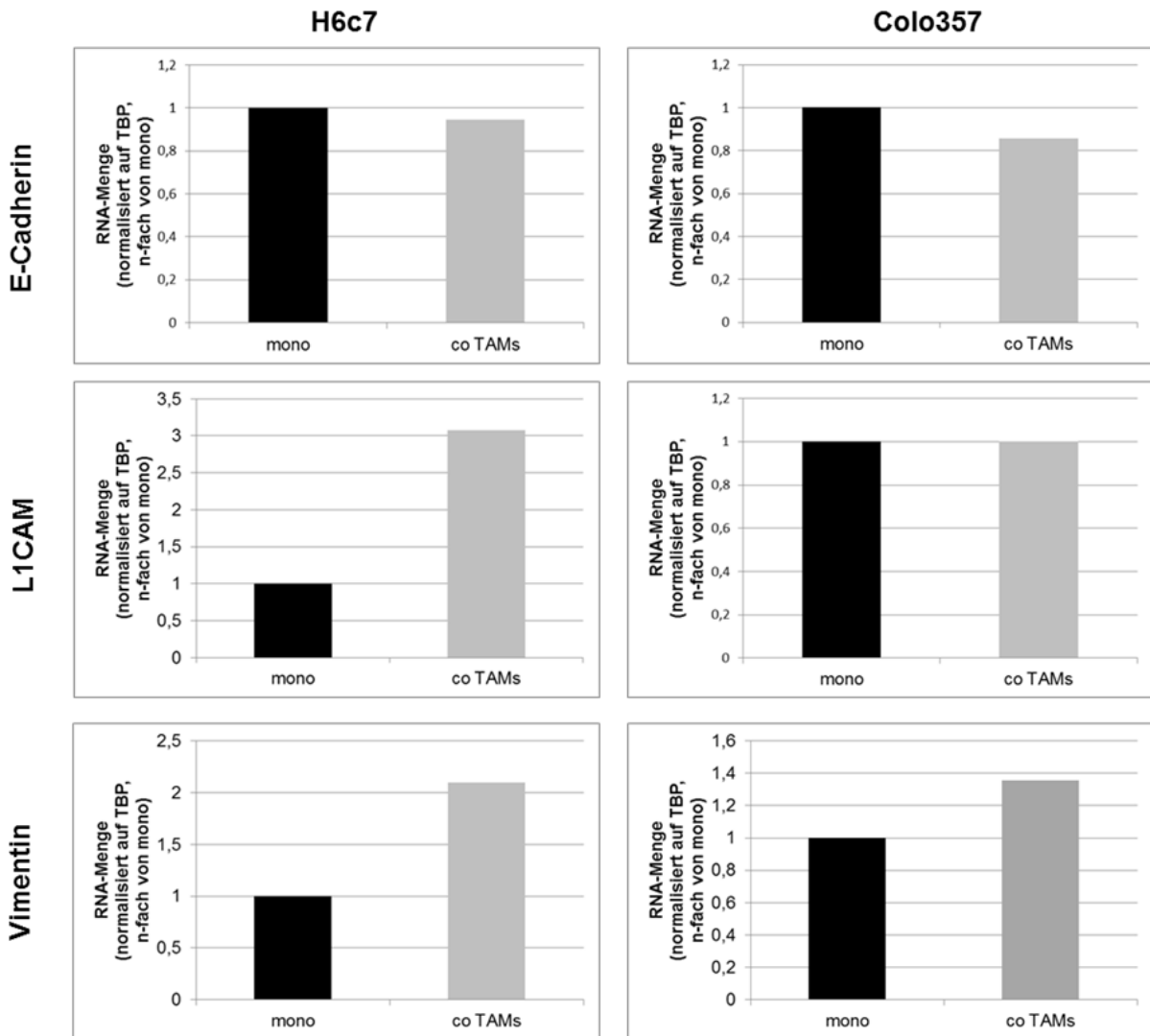
Um den funktionalen Einfluss von TAMs auf die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) in der pankreatischen Tumorigenese zu untersuchen, wurden EMT-assoziierte Veränderungen wie Zellmorphologie und EMT-Markerexpression in prämaligen (H6c7) und malignen (Colo357) pankreatischen Gangepithelzellen analysiert, die in Transwell-Co-Kultursystemen in An- oder Abwesenheit von PDAC assoziierten Makrophagen kultiviert wurden. Während H6c7-Zellen noch einen epithelialen Phänotyp aufwiesen, zeigten Colo357-Zellen *per se* bereits mesenchymale Charakteristika, wie die erhöhte basale Expression von Vimentin und L1CAM zeigt (siehe **Abbildung 4.15**). Beide Zelllinien zeigten jedoch nach Co-Kultur mit TAMs eine spindelförmige Morphologie, die mit EMT-Induktion assoziiert wird (**Abbildung 4.6**).



**Abbildung 4.6: H6c7- und Colo357-Zellen erwerben in Gegenwart von PDAC assoziierten Makrophagen eine spindelförmige Morphologie.** Beide Zelllinien wurden für eine Woche mono- (mono) oder mit TAMs co-kultiviert (co-TAMs). Die Pfeile zeigen die EMT-assoziierte Spindelform. Vergrößerung x100

Dazu passend zeigte die rtPCR-Analyse, dass die Transkription von EMT-Markern in beiden Zelllinien in Gegenwart der PDAC assoziierten Makrophagen verändert war, was in einem leichten Rückgang der mRNA-Menge des epithelialen E-Cadherins und einem Anstieg der mRNA-Menge des mesenchymalen Vimentins äußerte (**Abbildung 4.7**).



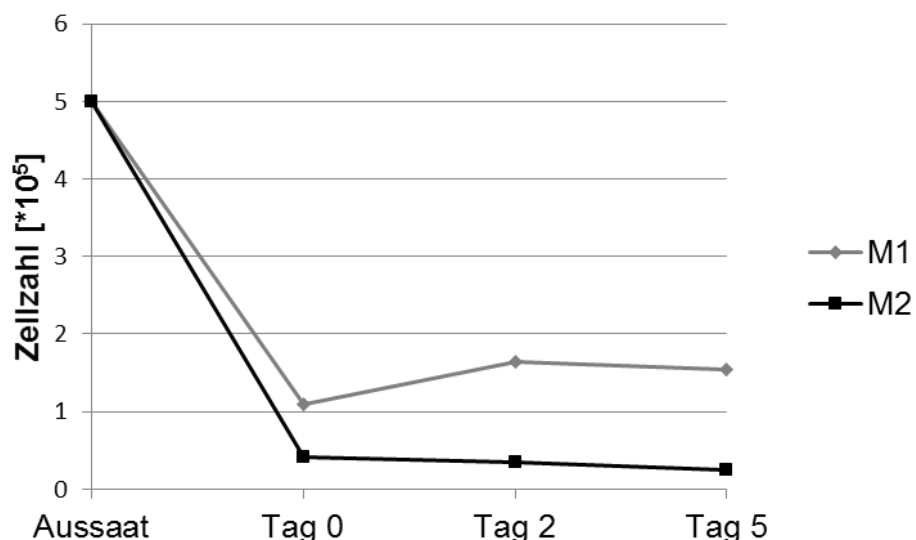


**Abbildung 4.7: PDAC assoziierte Makrophagen verändern die Expression von EMT-Markern in H6c7- und Colo357-Zellen.** Die Zellen wurden für eine Woche mono- (mono) oder mit TAMs co-kultiviert (co TAMs). Die RNA der Epithelzellen wurde per rtPCR auf E-Cadherin, L1CAM, Vimentin und TBP untersucht. Angegeben sind relative Einheiten normalisiert auf TBP, als n-Faches der Expression der Monokultur. Es ist eines von 3 repräsentativen Experimenten gezeigt.

Während die Co-Kultur mit TAMs die bereits basal höhere Expression von L1CAM in Colo357-Zellen nicht beeinflusste, wurde diese in H6c7-Zellen in Anwesenheit von TAMs stark erhöht, ein Umstand der bereits mit erhöhter Apoptoseresistenz und gesteigerter Tumorigenität in diesen Zellen kausal in Verbindung gebracht wurde [145]. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass TAMs schon in prämaligen Pankreasgangepithelzellen zu EMT-assoziierten Veränderungen führen können.

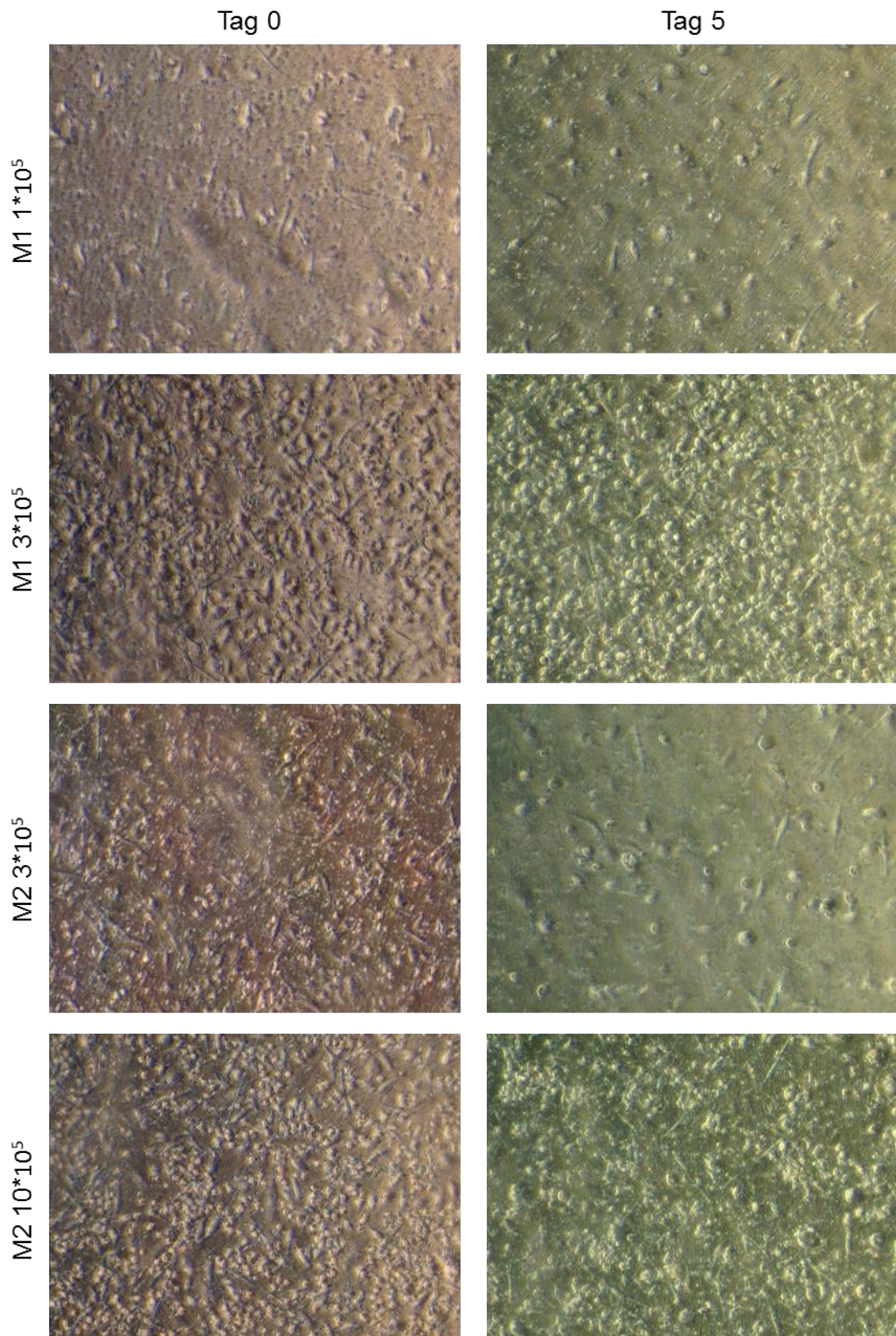
#### 4.2.3 Titration der Zellzahl von *in vitro* generierten Makrophagen

Da TAMs offenbar gleichermaßen pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen, stellte sich die Frage, ob die EMT-assoziierten Veränderungen, die in H6c7- und Colo357-Zellen in Gegenwart von TAMs beobachtet werden konnten, über pro- oder eher anti-inflammatorische Mediatoren vermittelt werden. Um dies zu überprüfen, wurden die beiden Pankreasgangepithelzelllinien in An- und Abwesenheit von *in vitro* generierten M1- oder M2-Makrophagen kultiviert. Dazu wurde zunächst die optimale initiale Zellzahl der beiden Makrophagenpopulationen für die Co-Kulturversuche austitriert. Dabei war in beiden Populationen eine starke Verringerung der Zellzahl nach 5 Tagen (gezählt ab dem Mediumwechsel, 24 Stunden nach Aussaat, Tag 0) zu verzeichnen. **Abbildung 4.8** zeigt den Verlauf der Zellzahlen über 5 Tage bei jeweils  $5 \cdot 10^5$  eingesetzten Zellen pro Makrophagenpopulation. Wie zu sehen ist, trat der Hauptverlust dabei bereits direkt nach der Aussaat und vor dem Mediumwechsel ein, und ist vermutlich durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Adhärenz der M1- und M2-Makrophagen am Transwell zu erklären. Nach 5 Tagen war letztendlich von den M1-Makrophagen noch ca. ein Drittel, bei den M2-Makrophagen nur etwa ein Zehntel der initialen Zellzahl wiederzufinden, d.h. etwa dreimal so viele M1- wie M2-Makrophagen waren am Kulturende noch vital.

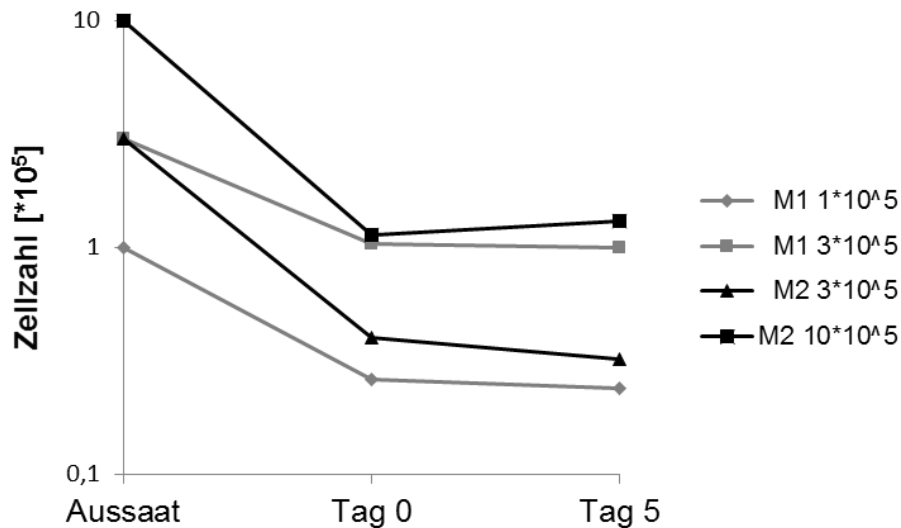


**Abbildung 4.8: Differenzielles Überleben von M1- und M2-Makrophagen unter Kulturbedingungen.** Die Abbildung zeigt den Verlauf der Zellzahlen von initial  $5 \cdot 10^5$  ausgesäten M1- und M2-Makrophagen über 5 Tage der Mono-Kultur aus einem explorativen Versuch.

Um die Zellzahlen beider Makrophagenpopulationen anzugleichen und damit zu gewährleisten, dass die Epithelzellen gleichen Mengen von Makrophagen ausgesetzt sind, wurden Kulturen mit unterschiedlichen initialen Zellzahlen angesetzt. Dabei wurden zwei Zellzahlverhältnisse von M1- und M2-Makrophagen ( $1 \cdot 10^5$  M1 und  $3 \cdot 10^5$  M2 sowie  $3 \cdot 10^5$  M1 und  $10 \cdot 10^5$  M2) gewählt, bei denen jeweils etwa dreimal mehr M2- als M1-Makrophagen ausgesät wurden, um die zuvor dargestellten unterschiedlichen Vitalzellzahlen zu kompensieren. **Abbildung 4.9** zeigt repräsentative Aufnahmen der Zelldichte im Transwell an Tag 0 und Tag 5, **Abbildung 4.10** zeigt die Ergebnisse von Zellzählungen an Tag 0 und Tag 5 bei initialen Zellzahlen von  $1 \cdot 10^5$  und  $3 \cdot 10^5$  für M1-Makrophagen bzw.  $3 \cdot 10^5$  und  $10 \cdot 10^5$  für M2-Makrophagen.



**Abbildung 4.9: Differenzielle Zelldichte unterschiedlicher Mengen ausgesäter M1- und M2-Makrophagen.** Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von  $1 \cdot 10^5$  und  $3 \cdot 10^5$  ausgesäten M1- bzw.  $3 \cdot 10^5$  und  $10 \cdot 10^5$  ausgesäten M2-Makrophagen 24 Stunden nach Aussaat und nach erneutem Mediumwechsel (Tag 0) sowie nach 5 Tagen Mono-Kultur (Tag 5). Vergrößerung  $\times 100$ .



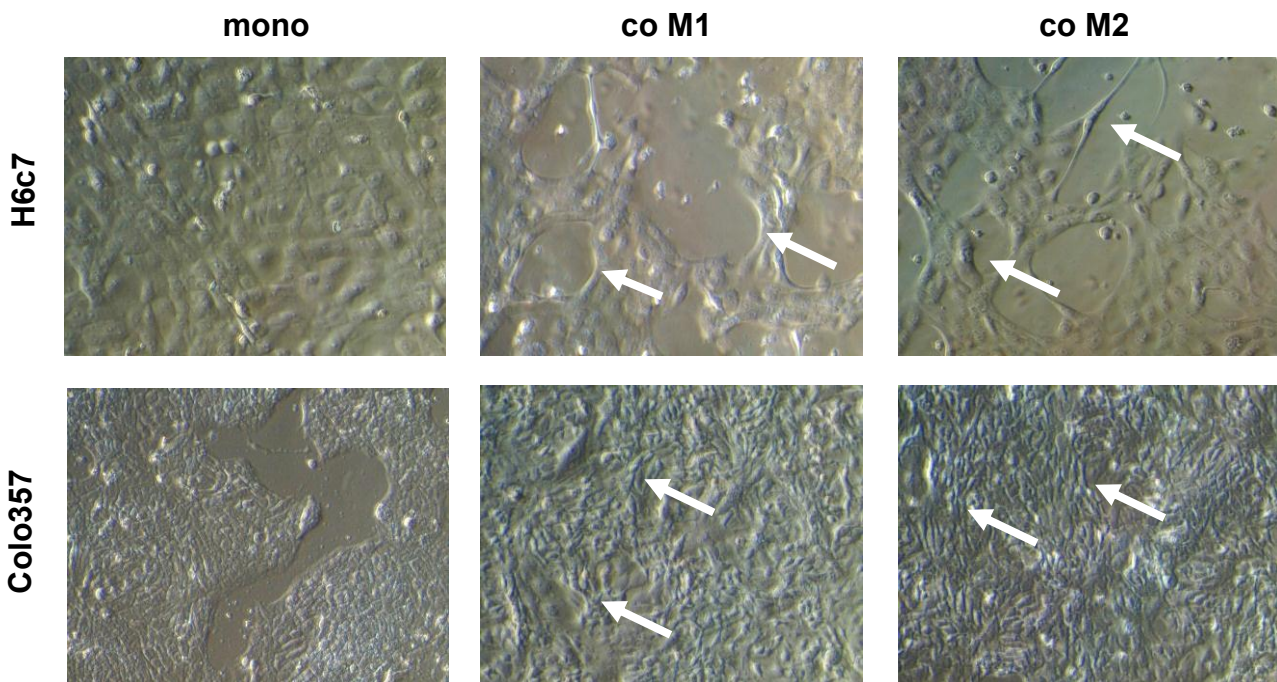
**Abbildung 4.10: Eine ähnliche Zellzahl von M1- und M2-Makrophagen nach 5 Tagen Kultur kann durch die Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen erreicht werden.** Die Abbildung zeigt repräsentative Zellzahlbestimmungen von initial ausgesäten  $1 \cdot 10^5$  und  $3 \cdot 10^5$  M1- bzw.  $3 \cdot 10^5$  und  $10 \cdot 10^5$  M2-Makrophagen an Tag 0 bzw. Tag 5 der Mono-Kultur mit logarithmischer Ordinatenendarstellung. Gezeigt ist ein Experiment von 2.

Dabei zeigte sich, dass die Zellzahl nach 5 Tagen bei  $1 \cdot 10^5$  eingesetzten M1-Makrophagen bzw.  $3 \cdot 10^5$  eingesetzten M2-Makrophagen jeweils durchschnittlich ca.  $0,3 \cdot 10^5$  Zellen betrug. Bei eingesetzten Zellzahlen von  $3 \cdot 10^5$  für M1- und  $10 \cdot 10^5$  für M2-Makrophagen ergaben die Zählungen nach 5 Tagen bei beiden Makrophagenpopulationen durchschnittlich ca.  $1 \cdot 10^5$  Zellen. Diese Zellzahl entsprach grob der Zellzahl der ausgesäten Epithelzellen in 12-Well-Kulturplatten nach 5 Tagen. Dieses Verhältnis von näherungsweise 1:1 von Epithelzellen und Makrophagen war ähnlich auch im PDAC Patientenkollektiv (siehe **Kapitel 4.1**) beobachtet worden. Daher wurden diese Zellzahlen stets für die folgenden Versuche ausgesät, um der *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen.



#### 4.2.4 H6c7- und Colo357-Zellen erfahren in Gegenwart von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen EMT-assoziierte Veränderungen.

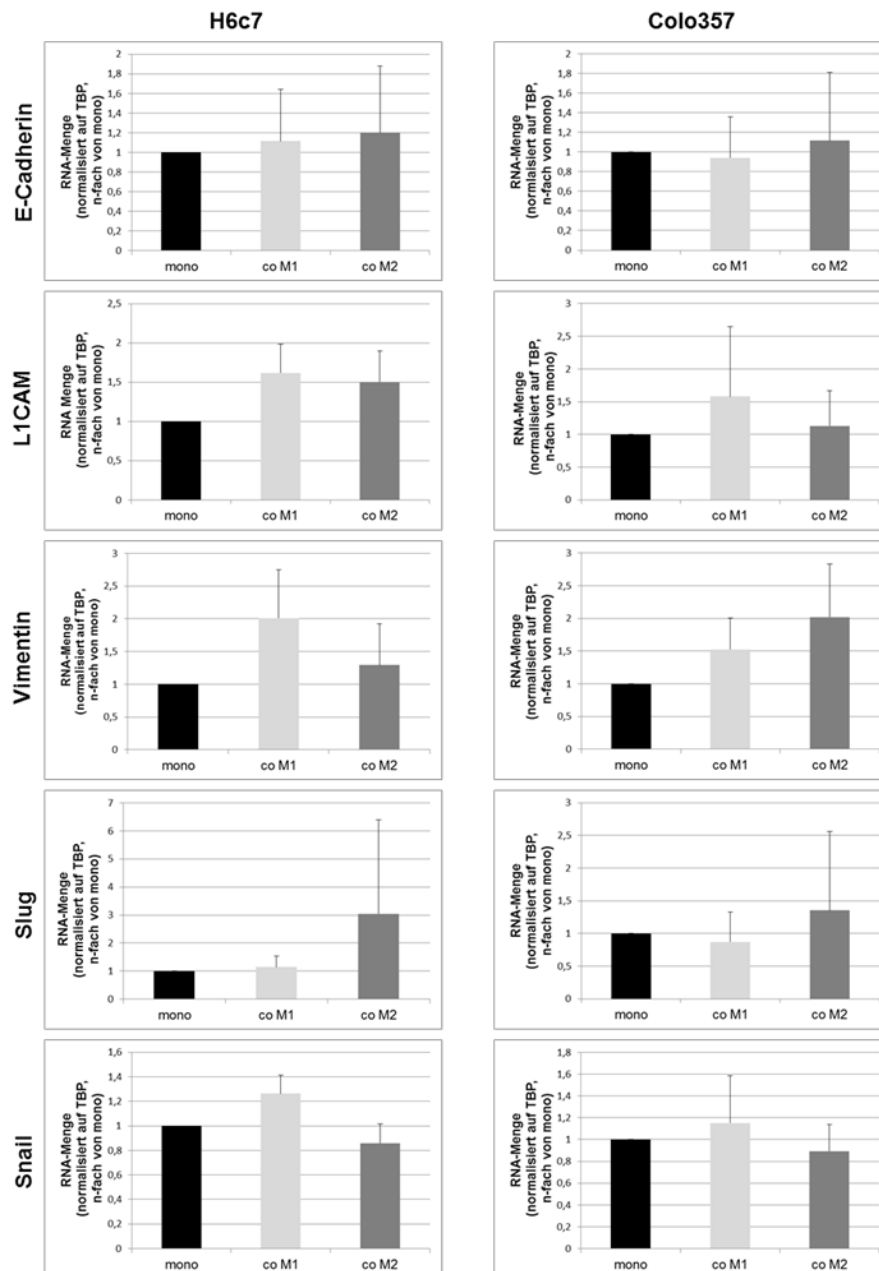
Um herauszufinden, ob pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften der Makrophagen zur EMT-Induktion beitragen, wurden H6c7- und Colo357-Zellen in An- oder Abwesenheit von M1- oder M2-Makrophagen in Transwell-Co-Kultursystemen kultiviert. Ähnlich wie nach Co-Kultur mit PDAC assoziierten Makrophagen (**Kapitel 4.2.2**) wiesen beide Epithelzelllinien nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen eine spindelförmige Morphologie auf (**Abbildung 4.11**).



**Abbildung 4.11: H6c7- und Colo357-Zellen erwerben in Gegenwart von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen eine EMT-assoziierte Spindelform.** Die Zellen wurden für eine Woche mono- (mono), mit M1-Makrophagen (co M1) oder mit M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Die Pfeile zeigen die EMT-assoziierte Spindelform. Vergrößerung x100.

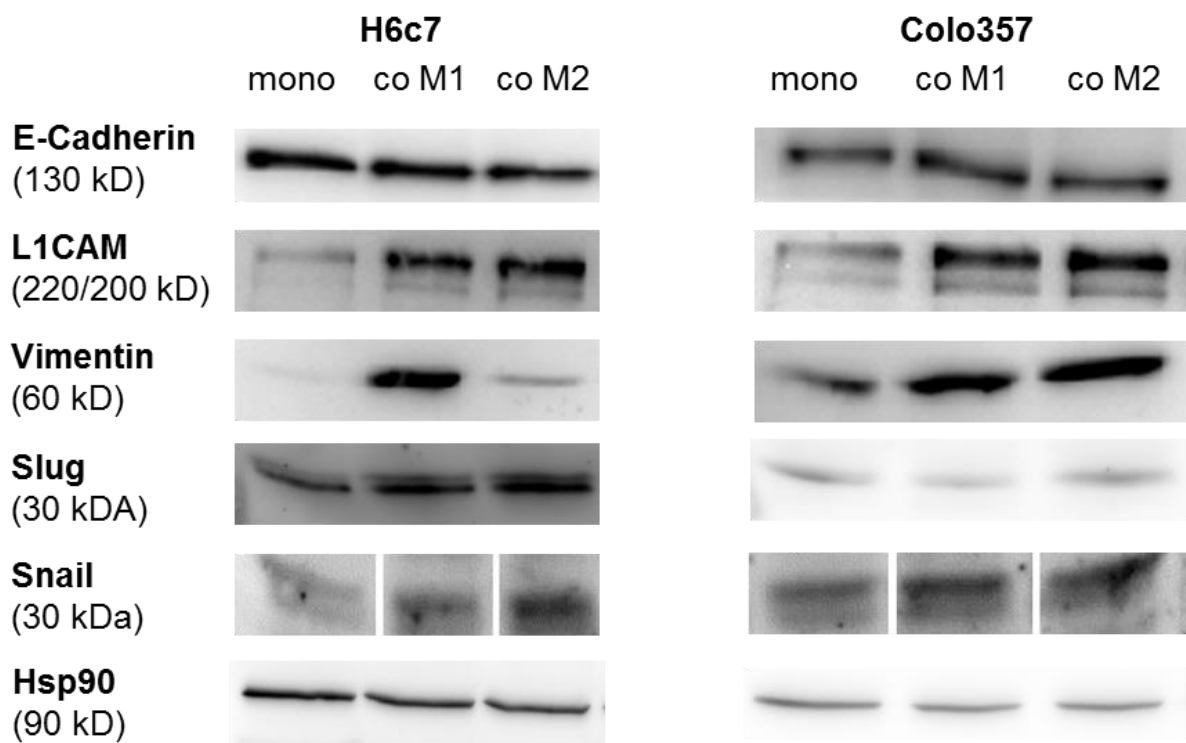
Als nächstes wurde die Expression von epithelialen (E-Cadherin) und mesenchymalen (L1CAM, Vimentin, Slug, Snail) Markern auf RNA- und Proteinebene in H6c7- und Colo357-Zellen, die in An- oder Abwesenheit von M1- und M2-Makrophagen kultiviert worden waren, untersucht. Die Analyse von EMT-Markern mittels rtPCR zeigte in keiner der beiden Epithelzelllinien eine Veränderung der Expression von E-Cadherin nach Co-Kultur mit Makrophagen im Vergleich zur Mono-Kultur. Sowohl in H6c7- als auch in Colo357-Zellen war jedoch die Expression von L1CAM und Vimentin nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen erhöht, wobei die Vimentinexpression

in H6c7-Zellen nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen stärker erhöht war und in Colo357-Zellen ausgeprägter nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen. Eine Erhöhung der Slug mRNA-Menge zeigte sich in beiden Epithelzelllinien nur nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen, die Expression der Snail-mRNA war in H6c7- und Colo357-Zellen hingegen nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen erhöht (**Abbildung 4.12**).



**Abbildung 4.12:** Analyse von epithelialen und mesenchymalen Markern in H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur mit *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen mittels rtPCR. E-Cadherin, L1CAM, Vimentin, Slug und Snail wurden per rtPCR in RNA-Extrakten von mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen analysiert. Alle Ergebnisse wurden auf TBP normalisiert und sind als n-Faches von Mono dargestellt. Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten  $\pm$ SA sind gezeigt.

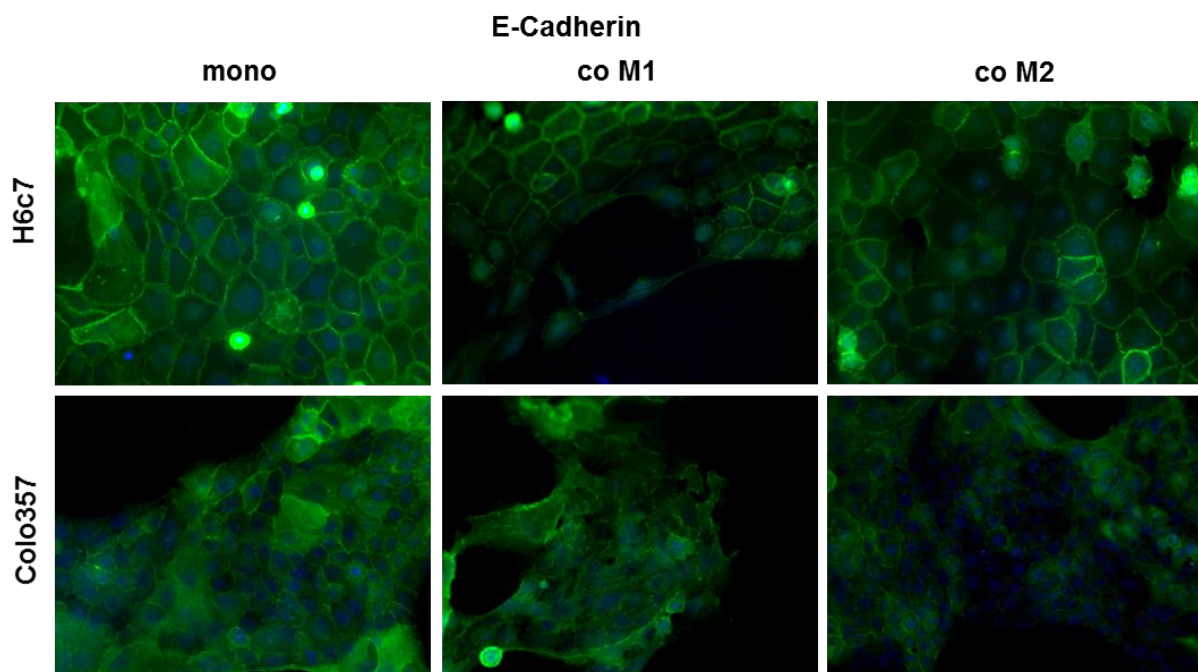
Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Westernblot-Analyse (**Abbildung 4.13**). Eine Veränderung der E-Cadherinexpression nach Co-Kultur konnte in keiner der beiden Zelllinien festgestellt werden, während die Expression von L1CAM und Vimentin in H6c7- und Colo357-Zellen durch Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen erhöht wurde. Der Effekt der Vimentininduktion war, analog zur rtPCR-Analyse, in H6c7-Zellen ausgeprägter nach Co-Kultur mit M1- als mit M2-Makrophagen. Obwohl sich auch auf Proteinebene leichte Erhöhungen in der Expression von Snail nachweisen ließen, war der Effekt im Gegensatz zur rtPCR-Analyse in beiden Zelllinien stärker ausgeprägt nach Co-Kultur mit M2- als mit M1-Makrophagen. Eine erhöhte Expression von Slug nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen konnte auf Proteinebene nur in H6c7-Zellen festgestellt werden.



**Abbildung 4.13: Analyse von epithelialen und mesenchymalen Markern in H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur mit *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen mittels Westernblot.** E-Cadherin, L1CAM, Vimentin, Slug, Snail und Hsp90, letzteres als Ladekontrolle, wurden in Ganzzelllysaten bzw. Kernextrakten (für Slug/Snail) von mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen mittels Westernblot detektiert. Es werden die Ergebnisse von einem repräsentativen Versuch von 3 gezeigt.

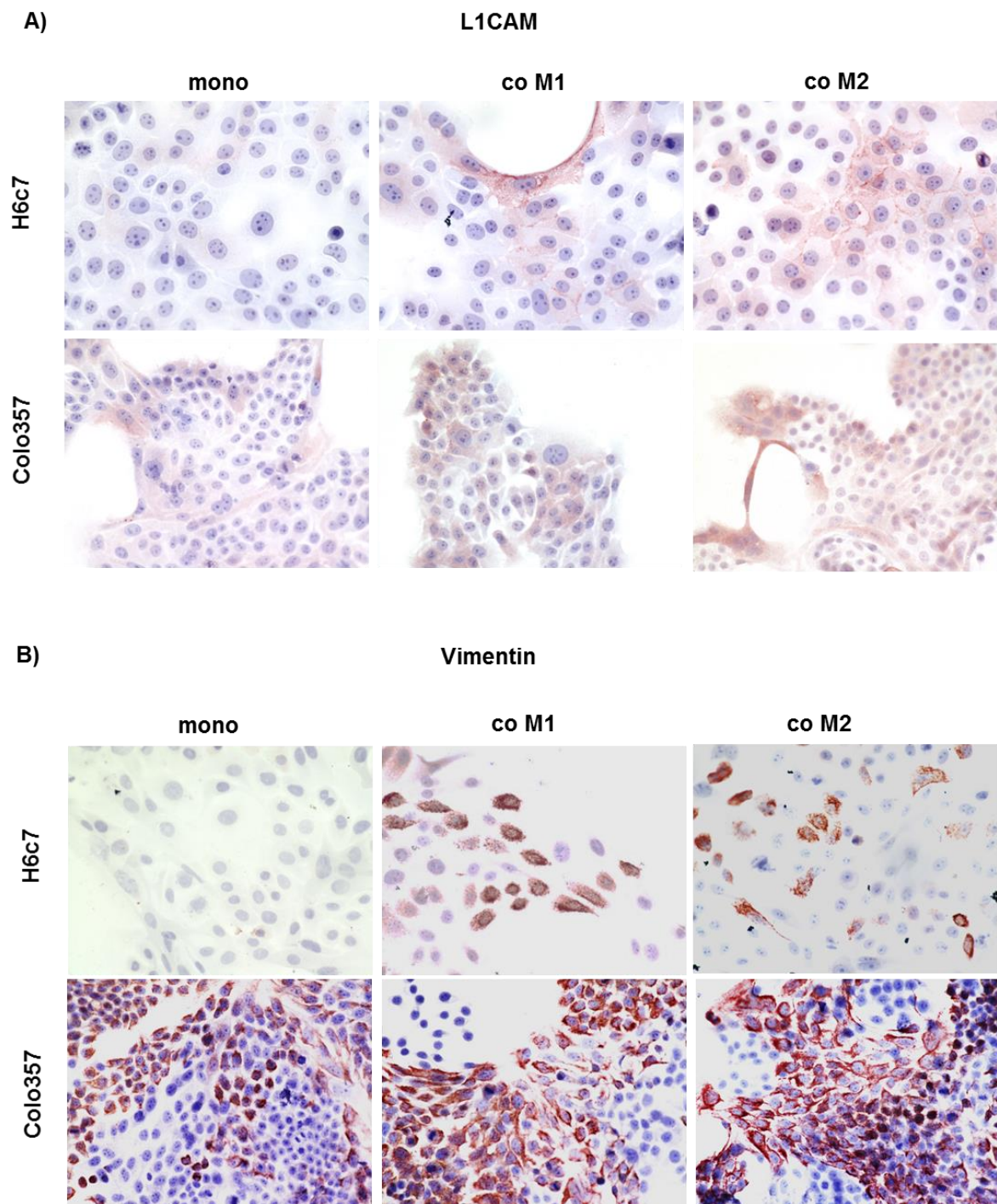


Eine Veränderung der Expression von E-Cadherin nach Co-Kultur mit M1- oder M2-Makrophagen in H6c7- und Colo357-Zellen konnte weder mittels rtPCR, noch im Westernblot detektiert werden. Ein Funktionsverlust von E-Cadherin kann jedoch auch durch die Translokation des Adhäsionsmoleküls von der Zelloberfläche ins Zytoplasma begründet sein. Daher wurde E-Cadherin auch mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Dabei zeigte sich eine verminderte Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche von beiden Zelllinien nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen (**Abbildung 4.14**).



**Abbildung 4.14: E-Cadherin transloziert nach Co-Kultur mit *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen von der Zelloberfläche ins Zytoplasma von H6c7- und Colo357-Zellen.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen von E-Cadherin in mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen. Vergrößerung x200

Die vermehrte Expression von L1CAM und Vimentin in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- oder M2-Makrophagen konnte, analog zu rtPCR und Westernblot, auch mittels immunzytochemischer Färbung gezeigt werden (**Abbildung 4.15 A und B**).

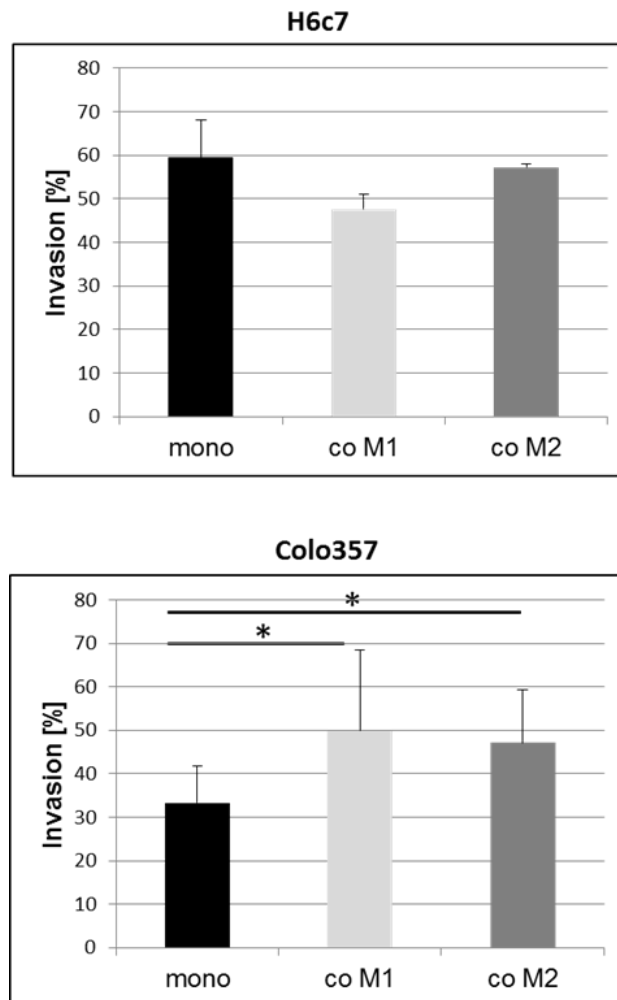


**Abbildung 4.15:** *In vitro* generierte M1- und M2-Makrophagen induzieren die Expression von L1CAM und Vimentin in H6c7- und Colo357-Zellen. Repräsentative Aufnahmen von immunzytochemischen Färbungen von L1CAM (A) und Vimentin (B) in mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen. Vergrößerung x200.

Es konnte also gezeigt werden, dass EMT-assoziierte Veränderungen in H6c7- und Colo357-Zellen analog zu den Co-Kulturen mit TAMs (4.2.2) auch in Gegenwart von sowohl pro-inflammatorischen M1-Makrophagen als auch anti-inflammatorischen M2-Makrophagen stattfinden.

#### 4.2.5 M1- und M2-Makrophagen erhöhen die Invasionsfähigkeit von Colo357-Zellen

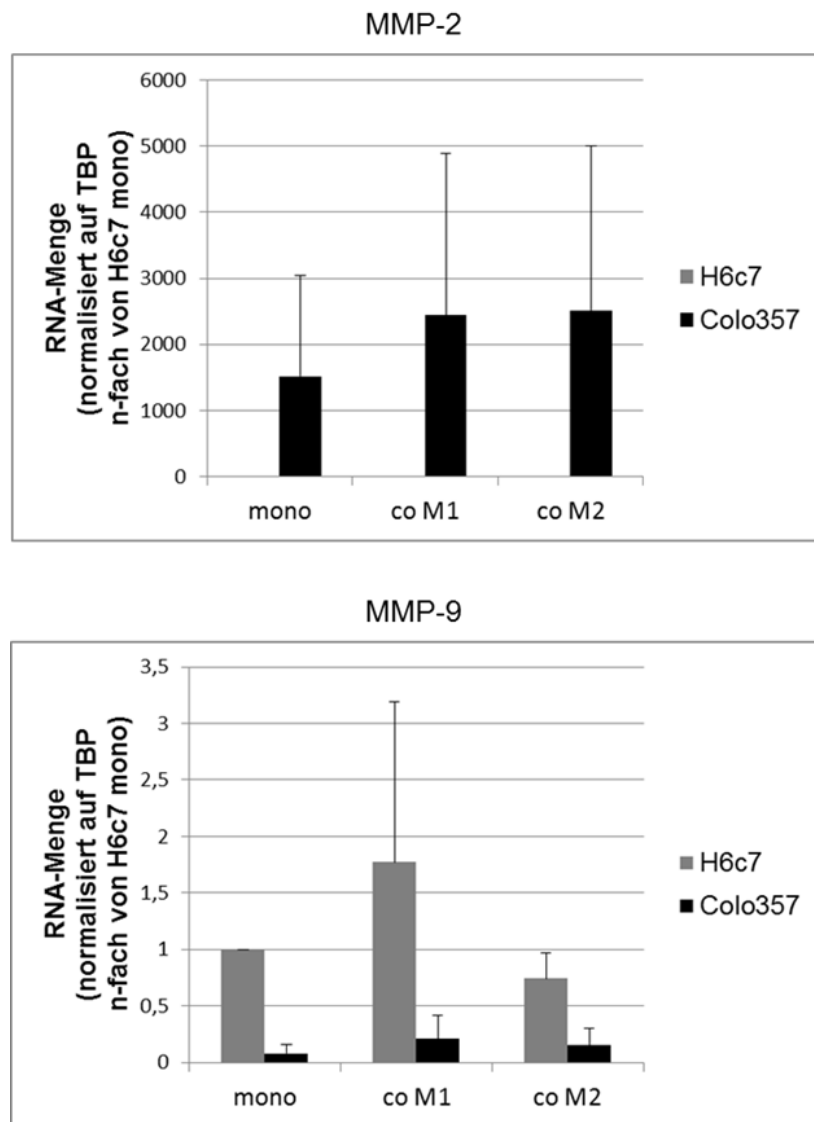
Als nächstes wurde mittels eines Invasions-tests in einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht, ob die durch Makrophagen vermittelten, EMT-assoziierten Veränderungen sich auch auf das Invasionsverhalten der Epithelzellen auswirken (**Abbildung 4.16**).



**Abbildung 4.16:** *In vitro* polarisierte M1- und M2-Makrophagen erhöhen die Zellinvasion von Colo357-Zellen. Die Zellinvasion von mono- und co-kultivierten H6c7- bzw. Colo357-Zellen wurde nach 24 Stunden in einer modifizierten Boyden-Kammer in Kollagen-I beschichteten Transwells bestimmt. Mittelwerte  $\pm$ SA des prozentualen Anteils invadierter Zellen aus 3 Versuchen sind gezeigt. \* =  $p < 0,05$

Obwohl beide Zelllinien nach Co-Kultur mesenchymale Charakteristika aufwiesen, zeigten nur Colo357-Zellen eine signifikant erhöhte Invasion durch eine Kollagen-I-Matrix. Interessanterweise war dieser Effekt nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen stärker ausgeprägt (Steigerung der Invasionsrate um ca. 50 %) als nach Co-Kultur mit

M2-Makrophagen (Steigerung der Invasionsrate um ca. 42 %). Um zu überprüfen, ob eine unterschiedliche Expression von Matrixmetalloproteasen (MMP) in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur eine Erklärung für die unterschiedlichen Invasionseigenschaften liefern könnten, wurde die Expression von MMP-2 und MMP-9 mittels rtPCR bestimmt. MMPs sind proteolytische Enzyme, die von der Zelle sezerniert werden und am Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) beteiligt sind. Diese Proteasen werden daher u.a. von der Zelle benötigt, um durch die EZM wandern zu können.



**Abbildung 4.17:** *In vitro* polarisierte M1- und M2-Makrophagen verändern die Expression von Matrixmetalloproteasen in H6c7- und Colo357-Zellen. Die Expression von MMP-2 und -9 wurde per rtPCR aus RNA-Extrakten von mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen analysiert. Alle Ergebnisse wurden auf TBP normalisiert und sind als n-Faches von H6c7-Mono dargestellt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SA aus 3 unabhängigen Experimenten

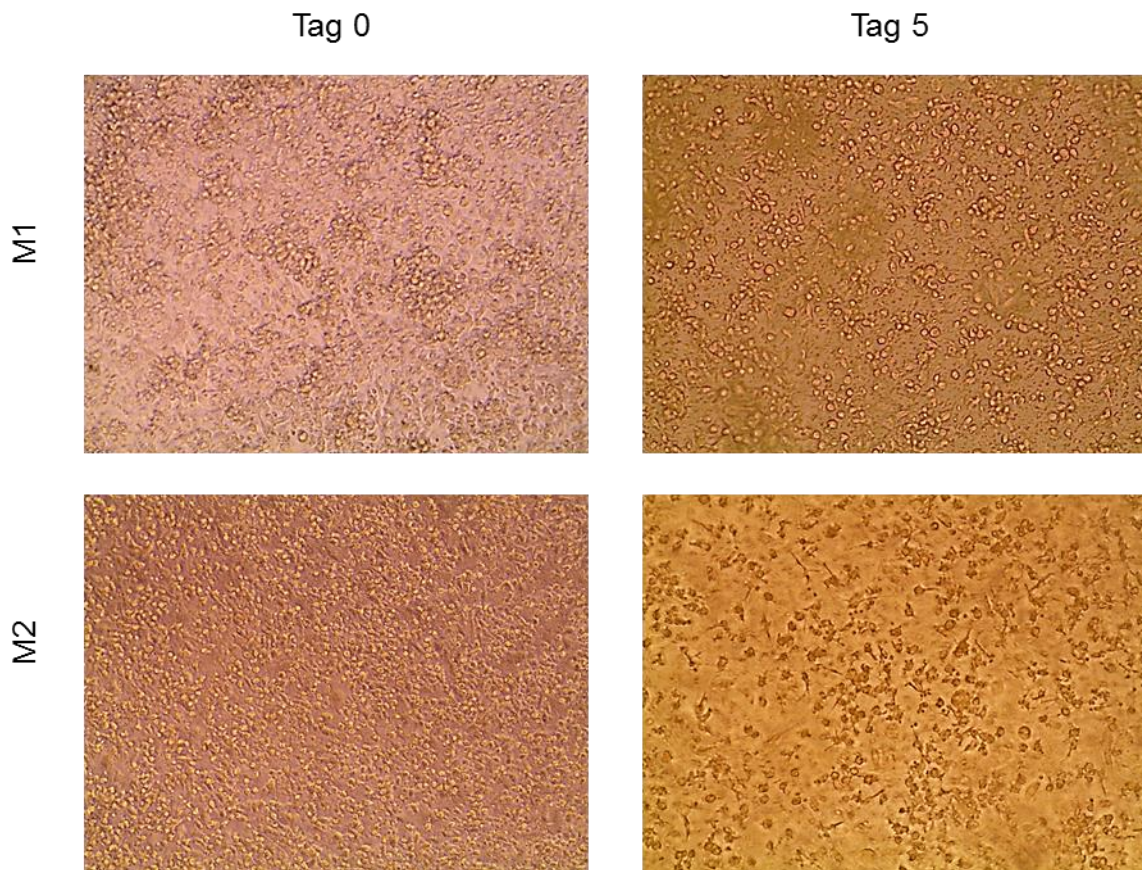
Während die schon basal im Vergleich zu Colo357-Zellen niedrigere Expression in H6c7-Zellen nicht beeinflusst wurde, war die Expression von MMP-2 in Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen hochreguliert. Die Expression von MMP-9 war dagegen basal in H6c7-Zellen höher als in Colo357-Zellen und stieg in beiden Zelllinien nur unter Co-Kultur mit M1-, nicht aber mit M2-Makrophagen an (**Abbildung 4.17**).

Die durch M1- und M2-Makrophagen vermittelten Veränderungen des EMT-Status in Colo357-Zellen äußerten sich auch auf funktionaler Ebene durch eine gesteigerte Zellinvasion, wobei diese nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen stärker ausgeprägt war.

#### **4.2.6 M1-Makrophagen weisen nach Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen M2-Charakteristika auf**

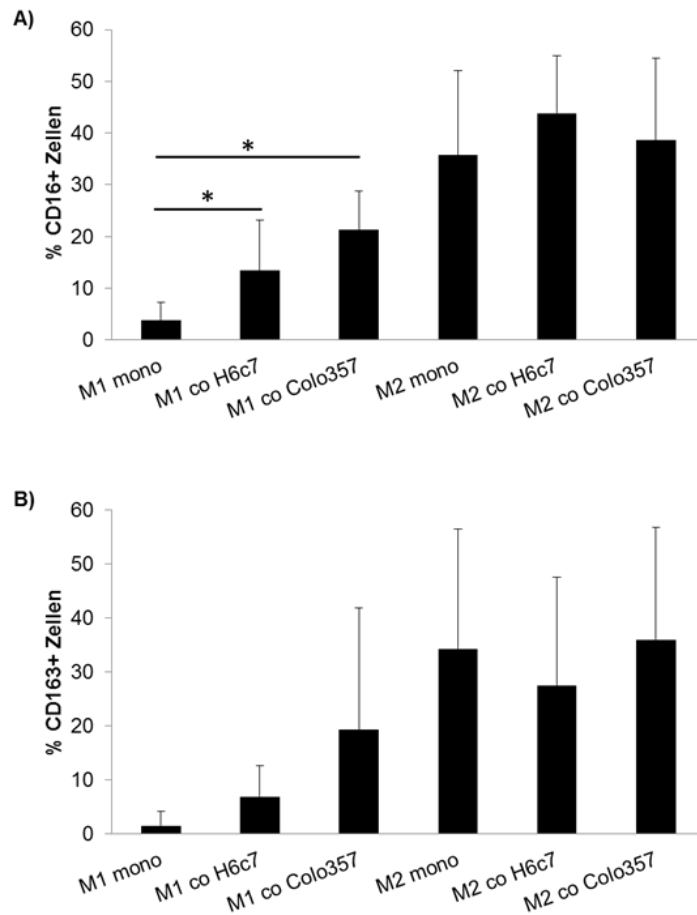
Makrophagen, die unter dem Einfluss differenzierender Stimuli einen bestimmten Phänotyp angenommen haben, können durch Exposition gegenüber weiteren Faktoren repolarisiert werden [148–152]. Unter der Annahme, dass die Tumormikroumgebung M1-Makrophagen zumindest teilweise zu einem tumorfördernden M2-Phänotyp verändert, wurde untersucht, ob H6c7- und Colo357-Zellen den Phänotyp und den funktionalen Einfluss von M1- und M2-Makrophagen verändern können. In der Tat nahmen M1-Makrophagen unter Co-Kultur mit H6c7-, und noch stärker in Anwesenheit von Colo357-Zellen verschiedene Charakteristika von M2-Makrophagen an. Wie in **Abbildung 4.18** zu sehen ist, wiesen M1-Makrophagen z.B. eine veränderte Morphologie unter Co-Kulturbedingungen auf. Während die M1-Makrophagen 24 Stunden nach der Aussaat in Transwells (Tag 0 der Co-Kultur) noch eine vermehrte Bildung von Zellhaufen aus kleineren, kugelförmigen Zellen zeigten, wie sie auch nach der Differenzierung in Teflonbeuteln auffällig war, glich sich das morphologische Erscheinungsbild nach 5 Tagen der Co-Kultur dem der M2-Makrophagen, mit vornehmlich vereinzelt, teils stark gestreckten Zellen an. Diese Beobachtung wurde nach Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen gemacht (Daten nicht gezeigt).





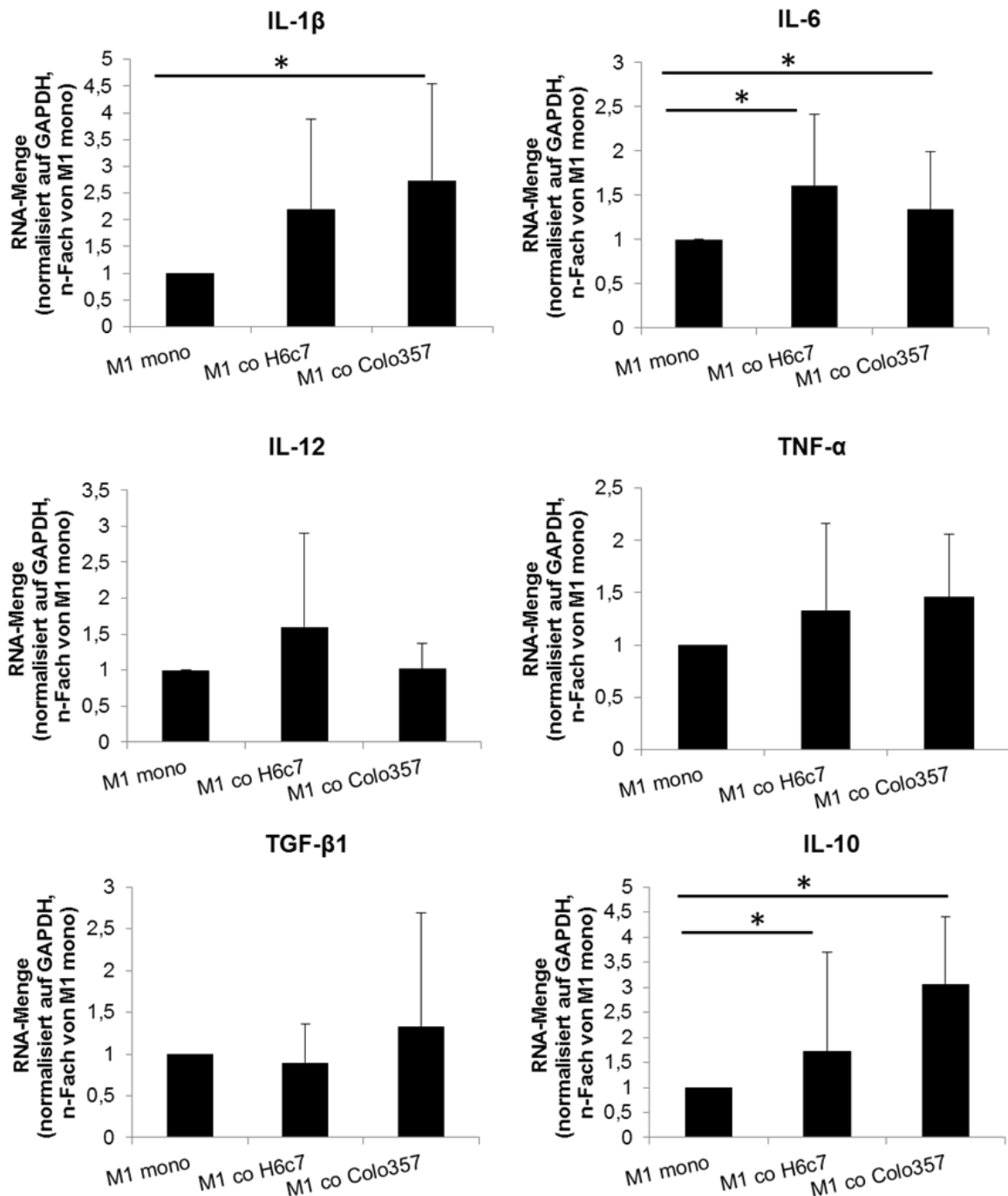
**Abbildung 4.18:** *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen nehmen unter Co-Kulturbedingungen eine M2-ähnliche Morphologie an. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von M1- und M2-Makrophagen zu Beginn (Tag 0) und nach 5 Tagen der Co-Kultur mit H6c7-Zellen. Mit Colo357-Zellen co-kultivierte Makrophagen zeigten eine vergleichbare Morphologie. Vergrößerung x140.

Neben der Morphologie wurden als nächstes die beiden M2-assoziierten Marker CD16 und CD163 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Verglichen mit mono-kultivierten M1-Makrophagen war die Zahl an CD16+ Zellen nach Co-Kultur mit H6c7- bzw. Colo357-Zellen 3- bzw. 5-fach erhöht (**Abbildung 4.19 A**). Auch war die Zahl von CD163+ Zellen unter den M1-Makrophagen in Anwesenheit von H6c7- bzw. Colo357-Zellen mehr als 3- bzw. 10-fach erhöht (**Abbildung 4.19 B**). Im Gegensatz dazu war der Anteil von CD16+ und CD163+ Zellen in den M2-Makrophagen unter den verschiedenen Kulturbedingungen fast unverändert (**Abbildung 4.19 A und B**).



**Abbildung 4.19: *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen weisen nach Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen vermehrt M2-charakteristische Oberflächenmarker auf.** M1-Makrophagen (M1) und M2-Makrophagen (M2) wurden in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von H6c7- (co H6c7) oder Colo357-Zellen (co Colo357) für eine Woche kultiviert. Mono- und co-kultivierte Makrophagen wurden dann per Durchflusszytometrie auf die Expression der Oberflächenmarker CD16 (A) und CD163 (B) untersucht. Gezeigt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen als Mittelwerte  $\pm$  SA aus 7 unabhängigen Versuchen. \*=  $p < 0,05$ .

Um den Phänotyp co-kultivierter M1-Makrophagen weiter zu charakterisieren, wurde RNA mono- und co-kultivierter M1-Makrophagen per rtPCR auf die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen untersucht. Wie in **Abbildung 4.20** zu sehen ist, zeigten co-kultivierte M1-Makrophagen eine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , aber auch des anti-inflammatorischen IL-10 nach Co-Kultur mit H6c7-, und stärker noch nach Co-Kultur mit Colo357-Zellen. Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 bzw. IL-12 war nach Co-Kultur mit H6c7-Zellen deutlicher als mit Colo357-Zellen bzw. nur nach Co-Kultur mit H6c7-Zellen erhöht.



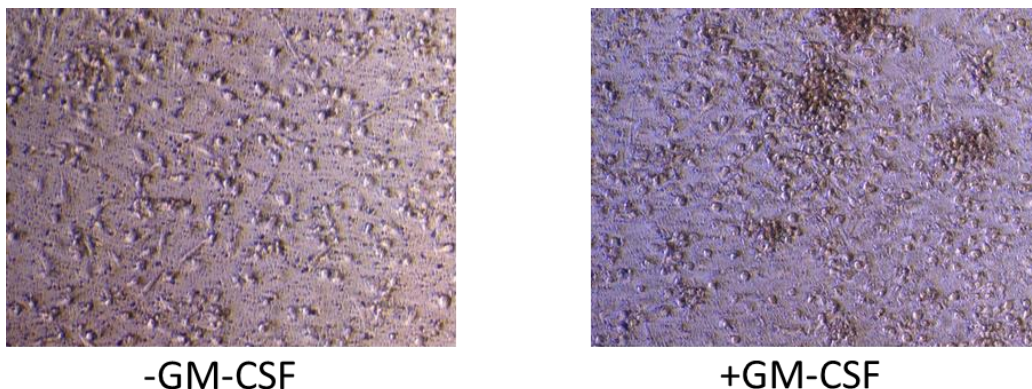
**Abbildung 4.20:** *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen weisen nach Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen M2-Charakteristika auf RNA-Ebene auf. RNA von mono- and co-kultivierten M1-Makrophagen wurde per rtPCR auf die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1 und GAPDH untersucht. Gezeigt ist die n-fache RNA-Expression in Bezug auf mono-kultivierte Zellen und normalisiert auf GAPDH. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SA aus 7 unabhängigen Experimenten. \* = p<0,05.



Die stärkste Erhöhung der Zytokinexpression wurde in M1-Makrophagen beobachtet, die mit Colo357-Zellen co-kultiviert wurden. Dieser Befund passte zu der Beobachtung, dass die Expression der Oberflächenproteine CD16 und CD163 unter diesen Bedingungen auch am stärksten ausgeprägt war (**Abbildung 4.19 A und B**). Interessanterweise wurde die Expression von TGF- $\beta$ 1 in M1-Makrophagen unter dem Einfluss von H6c7- und Colo357-Zellen nicht verändert (**Abbildung 4.20**). Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass M1-Makrophagen in Anwesenheit von prä-malignen, aber vor allem in Anwesenheit von malignen Pankreasgangepithelzellen teilweise einen M2-assoziierten Phänotyp annehmen.

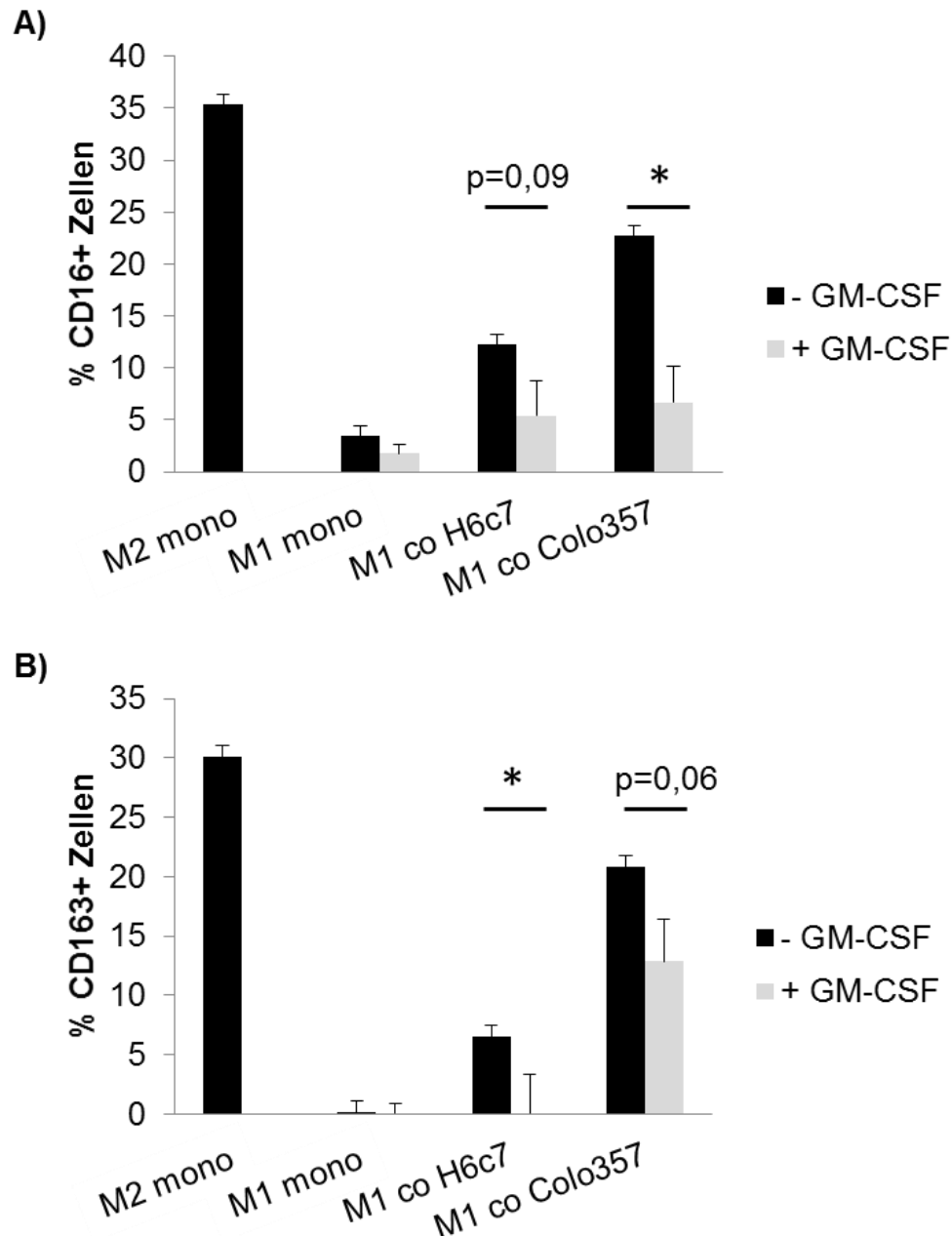
#### **4.2.7 GM-CSF inhibiert die Ausprägung von M2-Charakteristika in co-kultivierten M1-Makrophagen**

Um zu überprüfen, ob die Annahme des M2-Phänotyps für die EMT-fördernden Effekte der M1-Makrophagen unter Co-Kultur verantwortlich ist, wurde der M1-polarisierende Stimulus GM-CSF zu allen Mono- und Co-Kulturen über die gesamte Kulturzeit gegeben. In der Tat waren die zuvor beobachteten morphologischen Veränderungen in den M1-Makrophagen unter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen bei anhaltender Stimulation mit GM-CSF nicht mehr auszumachen. Die Zellen zeigten, ähnlich wie in der Differenzierungskultur, eine kugelige Zellform und bildeten vermehrt Aggregate (**Abbildung 4.21**).



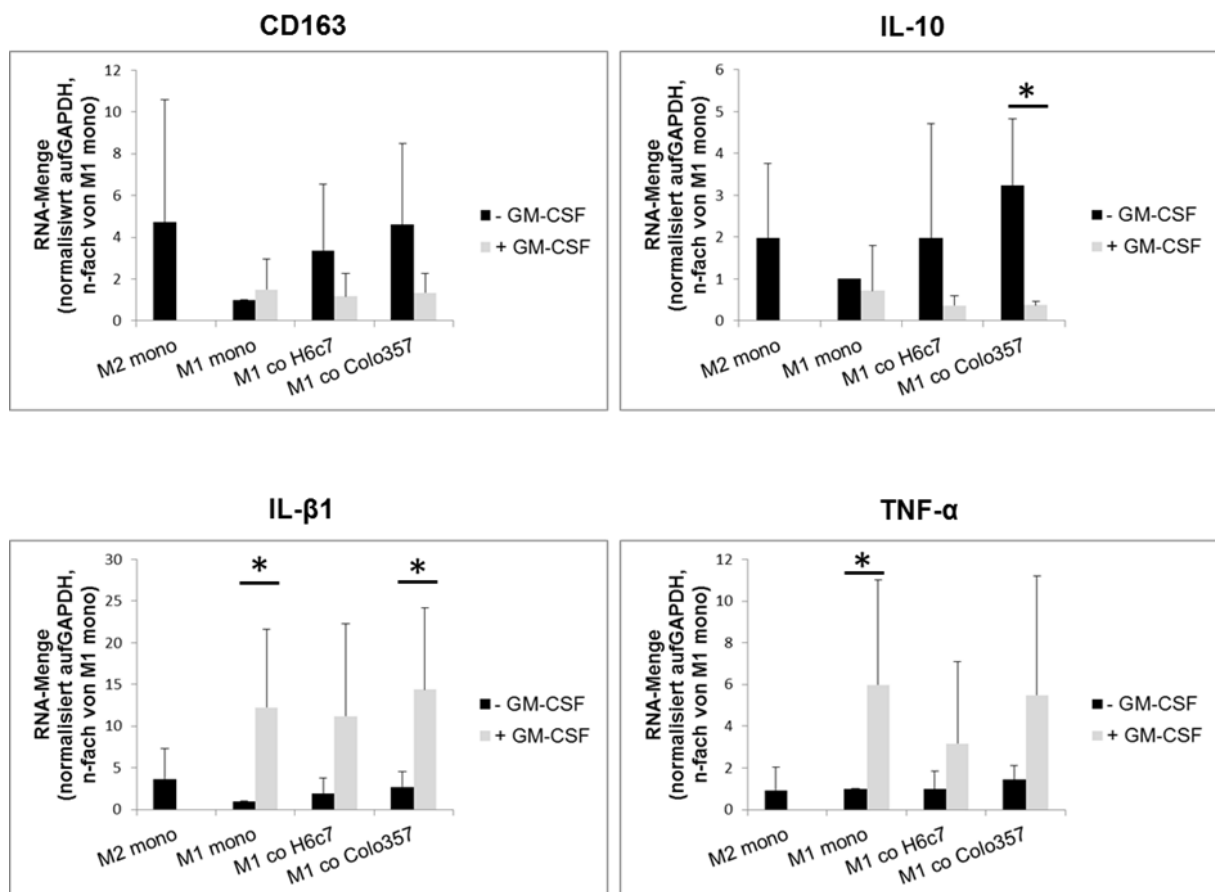
**Abbildung 4.21: *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen nehmen unter Co-Kultur mit H6c7-Zellen in Anwesenheit von GM-CSF keine M2-ähnliche Morphologie an.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von M1-Makrophagen nach 5 Tagen Co-Kultur mit H6c7-Zellen in Abwesenheit (-GM-CSF) und Anwesenheit (+GM-CSF) von 50 ng/ml GM-CSF. Vergrößerung x100.

Auch verminderte die Anwesenheit von GM-CSF deutlich den unter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen induzierten Anstieg von CD16+ und CD163+ Zellen in der M1-Makrophagenpopulation (**Abbildung 4.22 A und B**)



**Abbildung 4.22: GM-CSF inhibiert die Expression von M2-assoziierten Oberflächenmarkern in co-kultivierten M1-Makrophagen.** *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen (M1) wurden für eine Woche in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von H6c7- (co H6c7) oder Colo357-Zellen (co Colo357) kultiviert und entweder nicht (- GM-CSF) oder mit 50 ng/ml GM-CSF (+ GM-CSF) behandelt. M2-Makrophagen wurden parallel als Kontrolle kultiviert und analysiert. Mono- und co-kultivierte Makrophagen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von CD16 (A) und CD163 (B) untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SA aus 7 unabhängigen Experimenten. \*=  $p < 0,05$ .

Passend zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse zeigte die rtPCR eine verringerte Expression von CD163 und IL-10 unter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen, wohingegen die Expression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zu den M1-Makrophagen aus den nicht mit GM-CSF stimulierten Kulturen stark erhöht war (Abbildung 4.23).

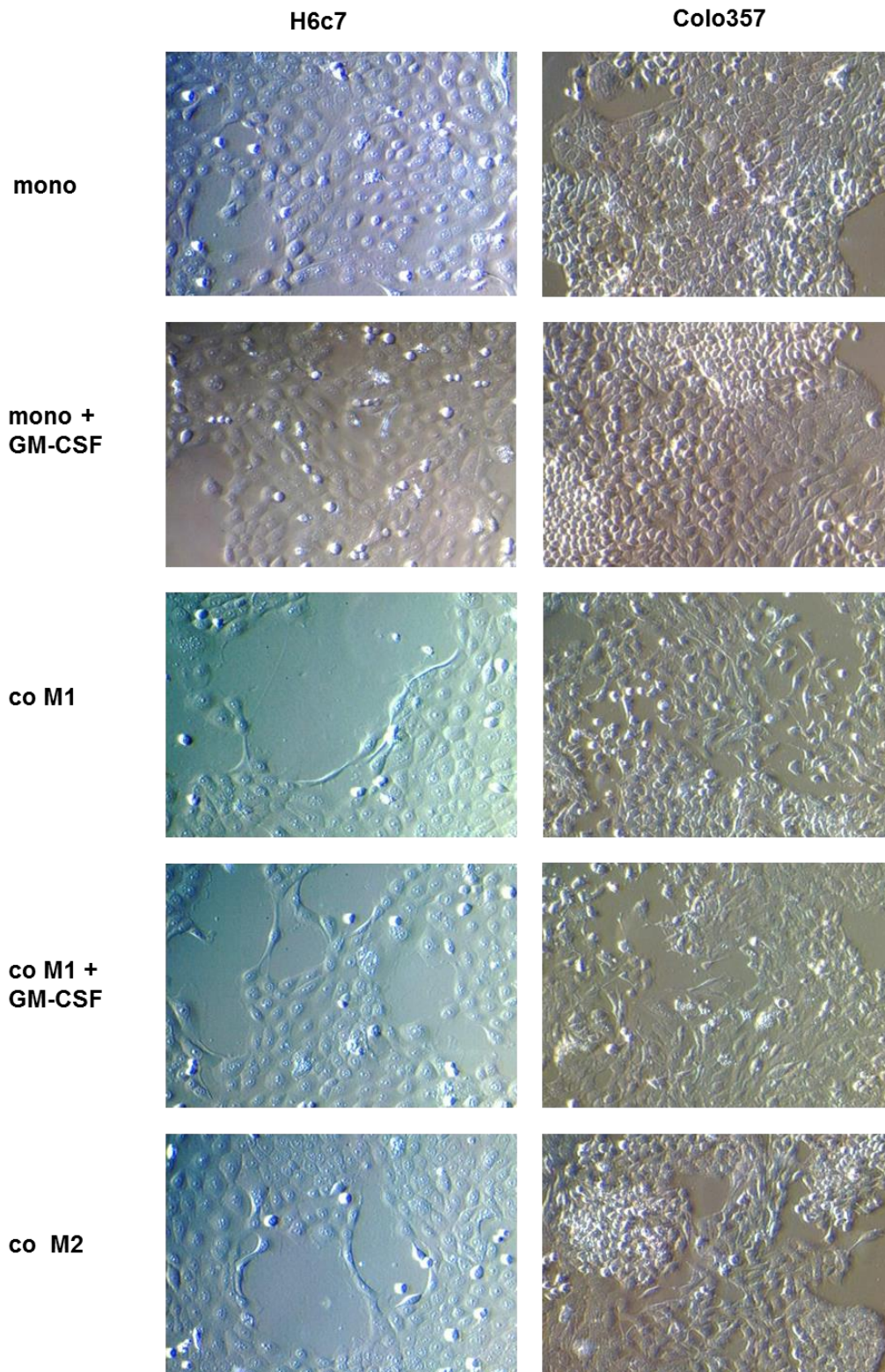


**Abbildung 4.23: GM-CSF inhibiert die Expression von M2-assoziierten und steigert die Expression von M1-assoziierten Genen in co-kultivierten M1-Makrophagen.** RNA von mono- und co-kultivierten M1-Makrophagen wurde per rtPCR auf die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 und GAPDH untersucht. Gezeigt ist die n-fache RNA-Expression in Bezug auf mono-kultivierte Zellen und normalisiert auf GAPDH. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SA aus 7 unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0,05$ .

Diese Daten zeigen, dass der pro-inflammatorische Phänotyp der M1-Makrophagen unter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen durch die Stimulation mit dem M1-polarisierendem Faktor GM-CSF erhalten werden kann.

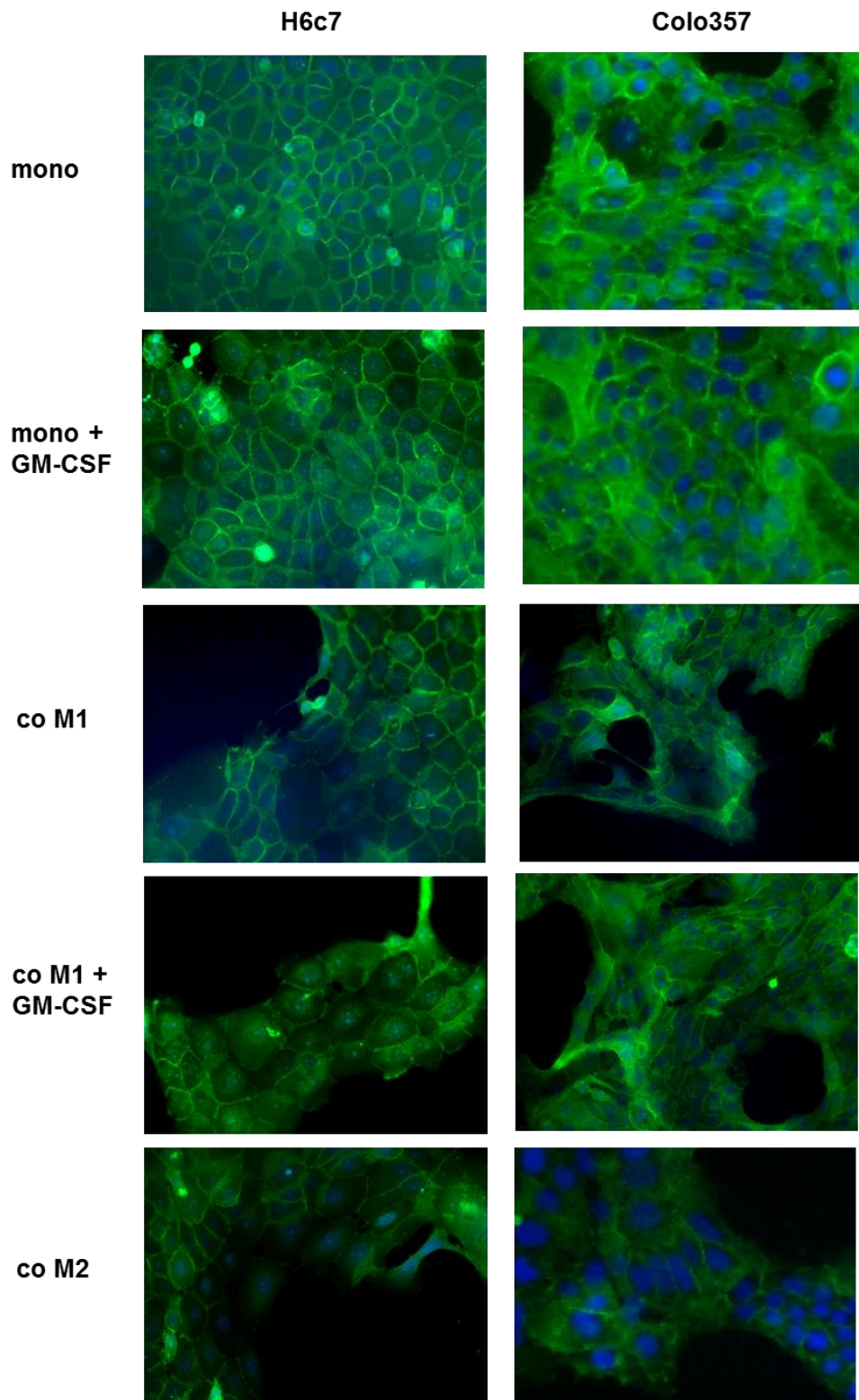
#### **4.2.8 M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren EMT in H6c7- und Colo357-Zellen.**

Um zu überprüfen, ob M1-Makrophagen ohne den Erwerb von M2-Charakteristika immer noch in der Lage sind, EMT in H6c7- und Colo357-Zellen zu induzieren, wurden die Zellmorphologie und EMT-Markerexpression in mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen in An- und Abwesenheit von GM-CSF analysiert. GM-CSF alleine beeinflusste dabei weder die Morphologie noch die EMT-Markerexpression von mono-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen (**Abbildung 4.24 - 28**). H6c7- und Colo357-Zellen, die jedoch mit M1-Makrophagen in Gegenwart von GM-CSF co-kultiviert worden waren, wiesen nach wie vor eine spindelförmige Morphologie (**Abbildung 4.24**), eine vermehrte Zahl von Zellen mit verminderter Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche (**Abbildung 4.25**) sowie eine erhöhte Expression von L1CAM (**Abbildung 4.26**) und Vimentin (**Abbildung 4.27**) auf, so wie es nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen ohne GM-CSF-Zusatz zu beobachten war. In der rtPCR zeigten sich zudem erhöhte Expressionslevel von Snail, ebenfalls analog zur Co-Kultur mit M1-Makrophagen ohne GM-CSF. Dieser Effekt war in Colo357-Zellen in Anwesenheit von GM-CSF noch stärker ausgeprägt als in der unbehandelten Co-Kultur mit M1-Makrophagen, während M2-Makrophagen die Snail-Expression nicht beeinflussten (siehe auch **Kapitel 4.2.4**). Die Expression von Slug wurde in H6c7- und Colo357-Zellen durch Co-Kultur mit M1-Makrophagen weder in An- noch in Abwesenheit von GM-CSF beeinflusst, und war nur nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen in beiden Epithelzelllinien erhöht (**Abbildung 4.28**, siehe auch **Kapitel 4.2.4**).

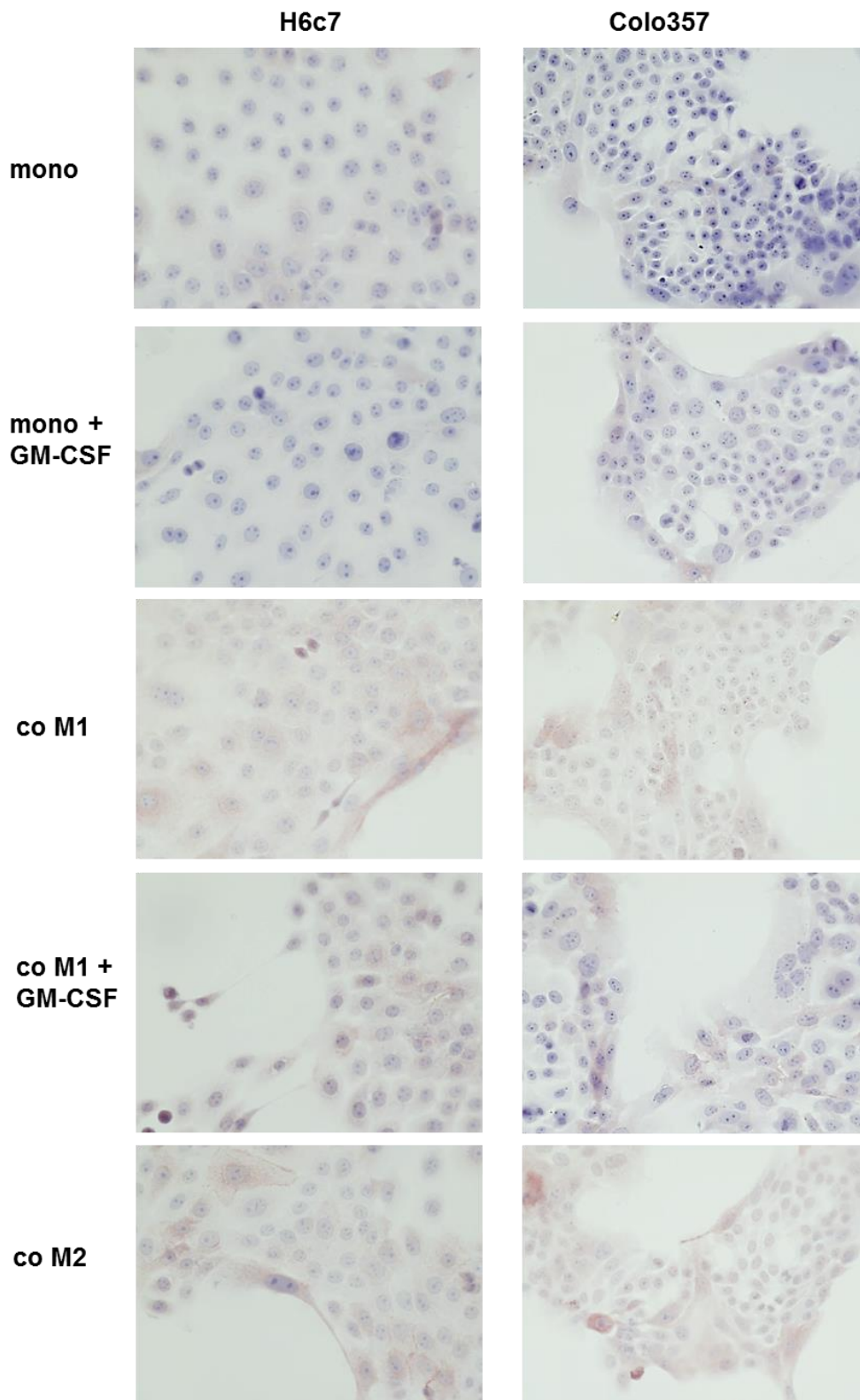


**Abbildung 4.24: *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren eine spindelförmige Morphologie in H6c7- und Colo357-Zellen.** H6c7- und Colo357-Zellen wurden für 5 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Wo angegeben, wurden 50 ng/ml GM-CSF zugesetzt (+ GM-CSF). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der Zellmorphologie aus einem von 3 unabhängigen Experimenten. Vergrößerung x100.

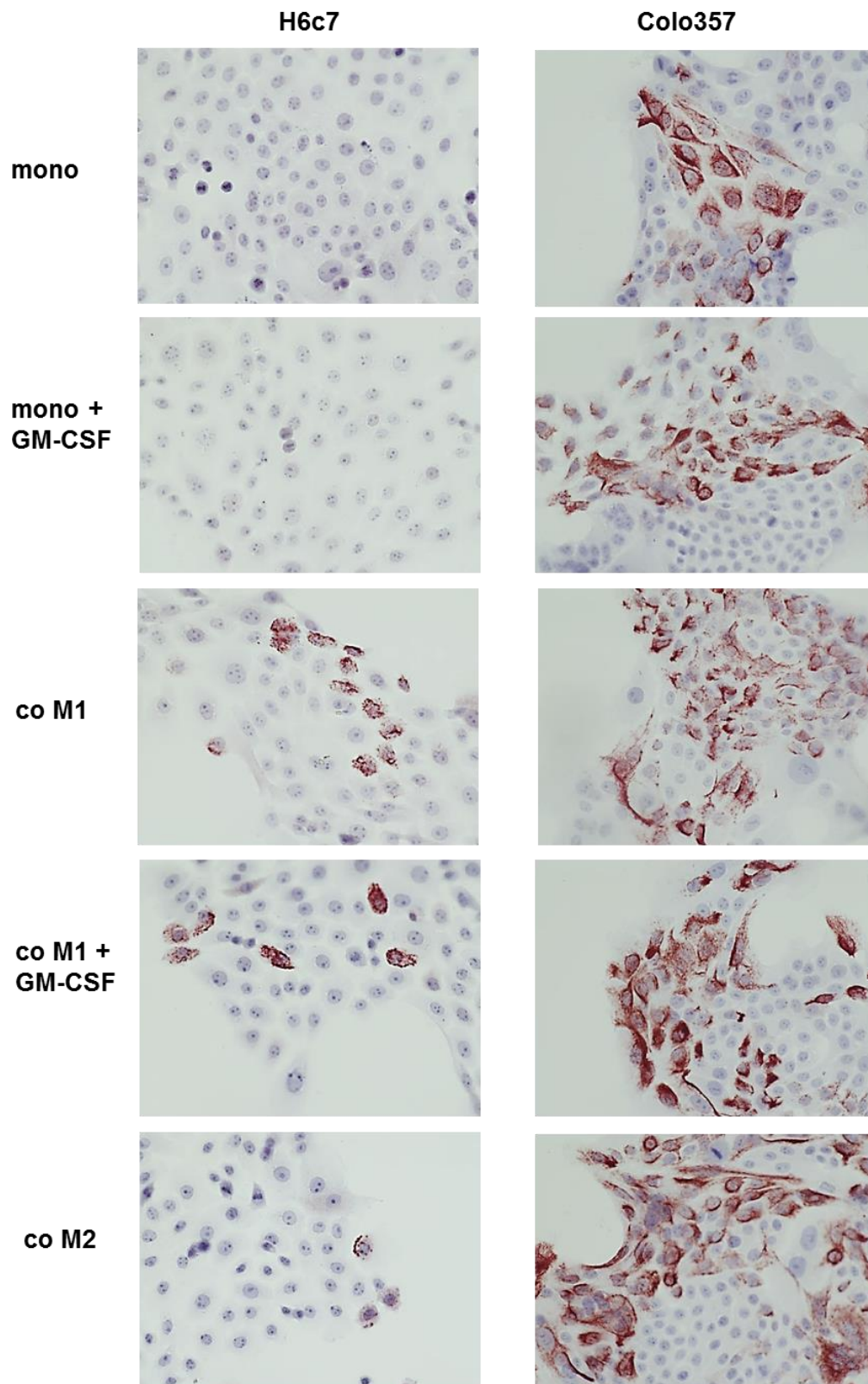




**Abbildung 4.25:** *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Translokation von E-Cadherin in H6c7- und Colo357-Zellen. H6c7- und Colo357-Zellen wurden für 5 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Wo angegeben, wurden 50 ng/ml GM-CSF zugesetzt (+ GM-CSF). Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von E-Cadherin aus einem von 3 unabhängigen Experimenten. Vergrößerung x200.

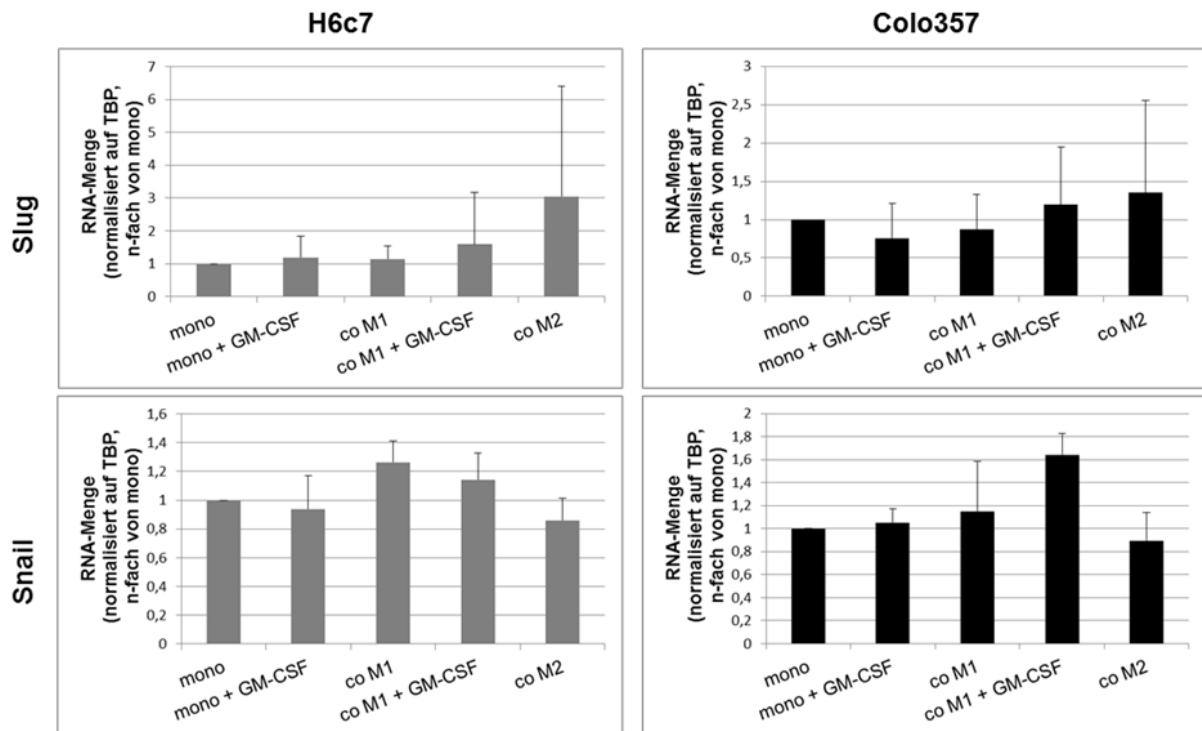


**Abbildung 4.26: *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Expression von L1CAM in H6c7- und Colo357-Zellen.** H6c7- und Colo357-Zellen wurden für 5 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Wo angegeben wurden 50 ng/ml GM-CSF zugesetzt (+ GM-CSF). Gezeigt sind immunzytochemische Färbungen von L1CAM aus einem von 3 unabhängigen Experimenten. Vergrößerung x200.



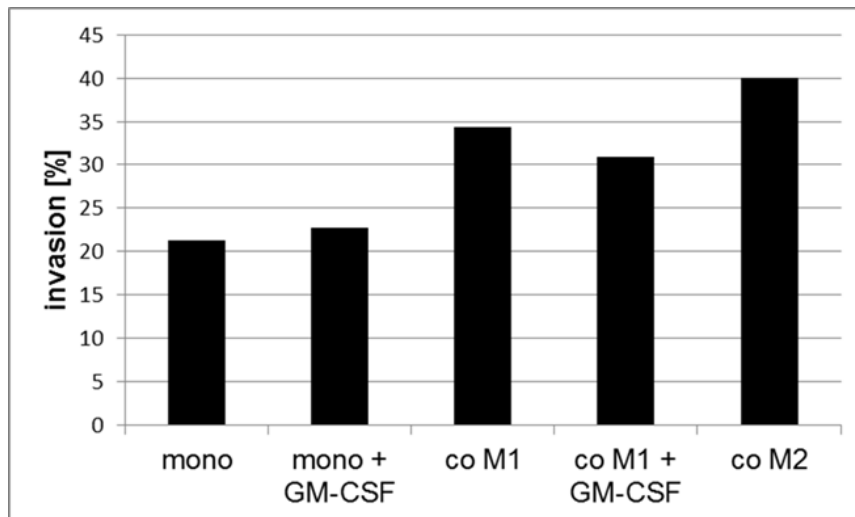
**Abbildung 4.27: *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Expression von Vimentin in H6c7- und Colo357-Zellen.** H6c7- und Colo357-Zellen wurden für 5 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Wo angegeben, wurden 50 ng/ml GM-CSF zugesetzt (+ GM-CSF). Gezeigt sind immunzytochemische Färbungen von Vimentin aus einem von 3 unabhängigen Experimenten. Vergrößerung x200.





**Abbildung 4.28: *In vitro* polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Expression von Snail in H6c7- und Colo357-Zellen.** H6c7- und Colo357-Zellen wurden für 5 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Wo angegeben, wurden 50 ng/ml GM-CSF zugesetzt (+ GM-CSF). Gezeigt ist die rtPCR-Analyse von Slug und Snail, normalisiert auf TBP als n-Faches von Mono, als Mittelwert  $\pm$ SA aus 3 unabhängigen Experimenten.

Da nur Colo357-Zellen mit einer gesteigerten Invasionsfähigkeit nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen reagierten (siehe **Kapitel 4.2.5**), wurde ferner untersucht, ob M1-Makrophagen mit einem stabilen pro-inflammatorischen Phänotyp entsprechend der Veränderung in der Morphologie und EMT-Markerexpression in der Lage sind, auch das Invasionsvermögen der Colo357-Zellen zu erhöhen. In der Tat zeigten Colo357-Zellen, die mit M1-Makrophagen in Anwesenheit von GM-CSF co-kultiviert worden waren, auch eine gesteigerte Invasionsfähigkeit (+ 37 % im Vergleich zur mit GM-CSF stimulierten Mono-Kultur) in der modifizierten Boyden-Kammer mit Kollagen-I-Matrix (**Abbildung 4.29**).



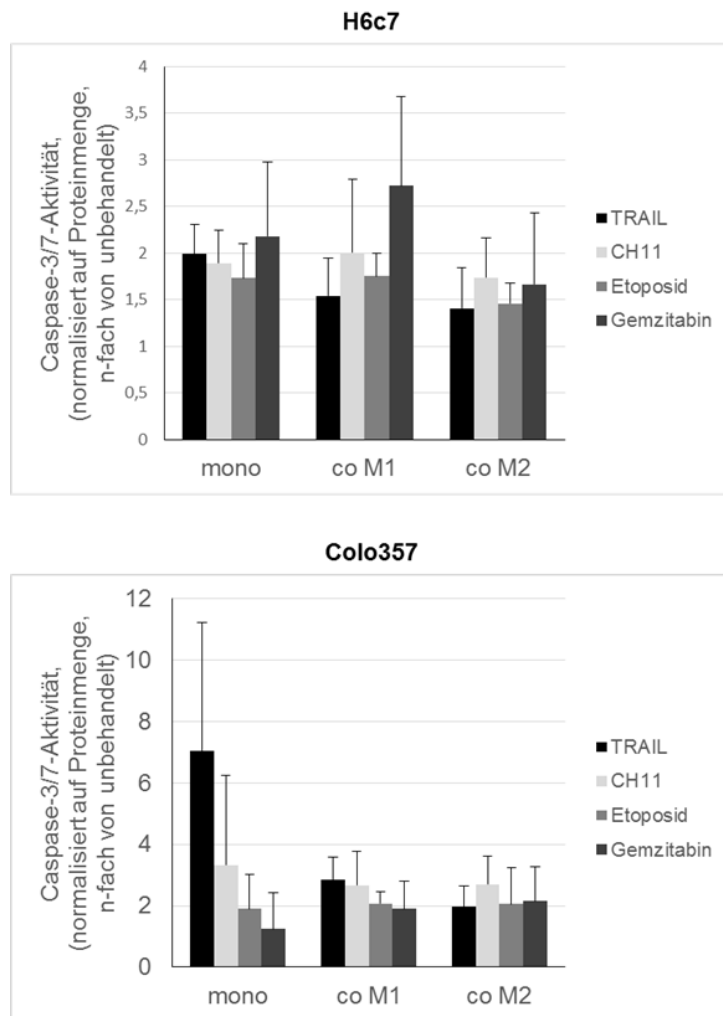
**Abbildung 4.29: *In vitro* generierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp fördern die Invasivität von Colo357-Zellen.** Colo357-Zellen wurden für 5 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) kultiviert. Wo angegeben, wurden 50 ng/ml GM-CSF zugegeben (+ GM-CSF). Gezeigt sind Zellinvasionsraten aus einem repräsentativen Experiment mittels einer modifizierten Boyden-Kammer mit Kollagen-I-Matrix nach 24 Stunden.

Die Daten von **Kapitel 4.2.8** zeigen, dass Makrophagen, die einen reinen pro-inflammatorischen Phänotyp besitzen, zu einer deutlichen Induktion von EMT in prä-malignen und malignen sowie zur Steigerung der Invasivität von malignen pankreatischen Gangepithelzellen in der Lage sind, ähnlich wie M1-Makrophagen mit M2-Charakteristika oder M2-Makrophagen.

### **4.3 Der Einfluss von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen auf das Apoptoseverhalten prämaligener und maligner Pankreasgangepithelzelllinien**

#### **4.3.1 M1- und M2-Makrophagen vermindern die Caspase-3/7-Aktivität in H6c7- und Colo357-Zellen nach Stimulation mit TRAIL.**

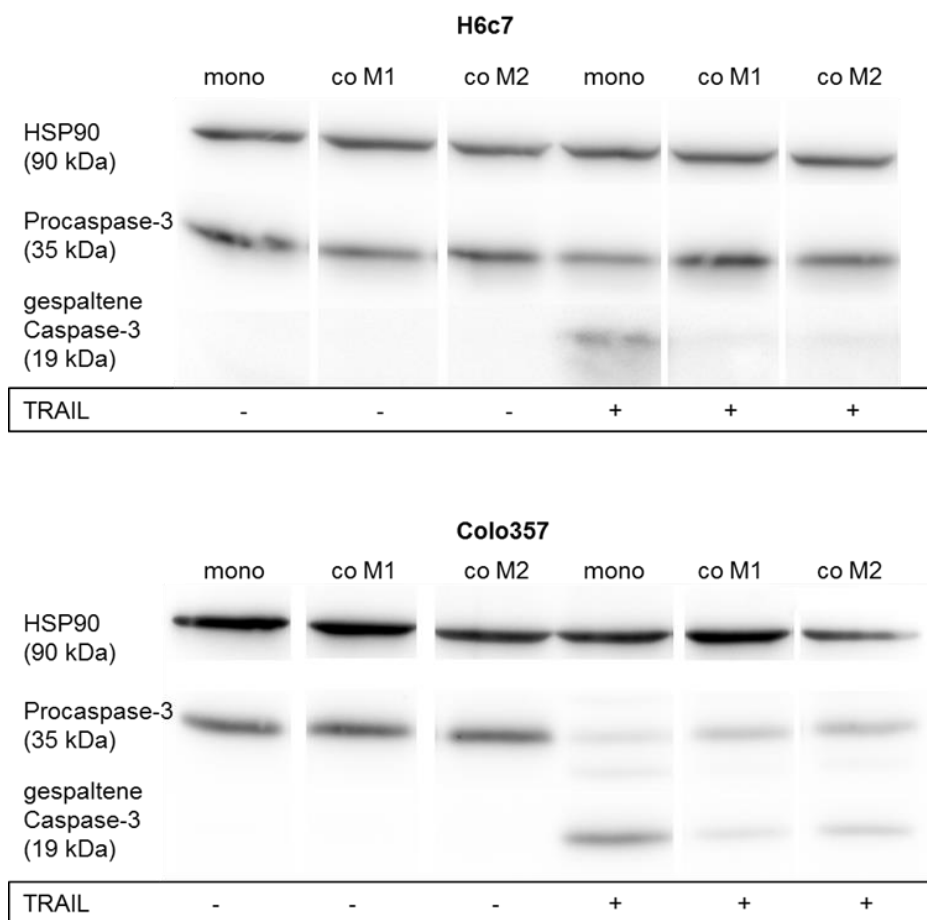
Veränderungen im Ansprechen auf endogene Apoptosestimuli (z.B. FASL und TRAIL) und Zytostatika sind ein bekanntes Phänomen in der Karzinogenese. Viele Krebsarten, so auch das PDAC, entwickeln eine Resistenz gegen bzw. eine verminderte Sensibilität gegenüber solchen Faktoren [127]. Um zu überprüfen, ob prämaligene und maligne Pankreasgangepithelzellen in Gegenwart von M1- und M2-Makrophagen einen apoptoseresistenten Phänotyp erwerben, wurden mono- und co-kultivierte H6c7- und Colo357-Zellen für 24 Stunden mit exogenem TRAIL, dem agonistischen FAS-Antikörper CH11 oder den Zytostatika Etoposid bzw. Gemzitabin behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Caspase-3/7-Aktivitätsassays analysiert. Dabei zeigten mono-kultivierte H6c7-Zellen nur eine Verdoppelung der Caspase-3/7-Aktivität nach Stimulation mit jedem der 4 eingesetzten Faktoren, während sie in mono-kultivierten Colo357-zellen nach Stimulation mit TRAIL um das 7-fache und nach Stimulation mit CH11 um das 3-fache anstieg. Die Zytostatika Etoposid und Gemzitabin erhöhten die Caspase-3/7-Aktivität in letzteren nur um das 2- bzw. 1,5-fache, was mit dem chemoresistenten Phänotyp dieser Zellen in Einklang steht [111]. Nach Co-Kultur mit M1- oder M2-Makrophagen reagierten weder H6c7- noch Colo357-Zellen mit einem wesentlich veränderten Ansprechen auf CH11, Etoposid oder Gemzitabin (**Abbildung 4.30**).



**Abbildung 4.30: *In vitro* polarisierte M1- und M2-Makrophagen reduzieren die Caspase-3/7-Aktivität in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.** H6c7- und Colo357-Zellen wurden nach 4 Tagen Kultur in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) für 24 Stunden mit 100 ng/ml TRAIL, 100 ng/ml CH11, 20 µg/ml Etoposid oder 10 µg/ml Gemzitabin behandelt. Gezeigt ist die luminometrisch gemessene Caspase-3/7-Aktivität normalisiert auf die Proteinmenge sowie auf die jeweilige unbehandelte Referenz als Mittelwert ± SA aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die Sensibilität gegenüber TRAIL war hingegen in H6c7-Zellen nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen deutlich vermindert. So war die Caspase -3/7-Aktivität um den Faktor 1,3 gegenüber der Mono-Kultur reduziert (**Abbildung 4.30**) und stärker noch nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen (Faktor 1,4). Noch deutlicher zeigten sich diese Effekte in Colo357-Zellen. Hier war die Caspase-3/7-Aktivität nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen um den Faktor 2,5 nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen um den Faktor 3,5 niedriger im Vergleich zur Mono-Kultur.

Um zu untersuchen, ob die o.g. verminderte Caspase-3/7-Aktivität durch eine verminderte Expression der Procaspase-3 zu erklären ist, wurde sowohl die ungespaltene (Procaspase) als auch die gespaltene Form mittels Westernblot detektiert. **Abbildung 4.31** zeigt entsprechend des Caspase-3/7-Assays eine deutlich verminderte Spaltung und damit Aktivierung von Caspase-3 nach Behandlung mit TRAIL für 24 Stunden in beiden Epithelzelllinien nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen. Die basale Expression der Procaspase-3 war hingegen in keiner der beiden Zelllinien unter Co-Kultur verändert.



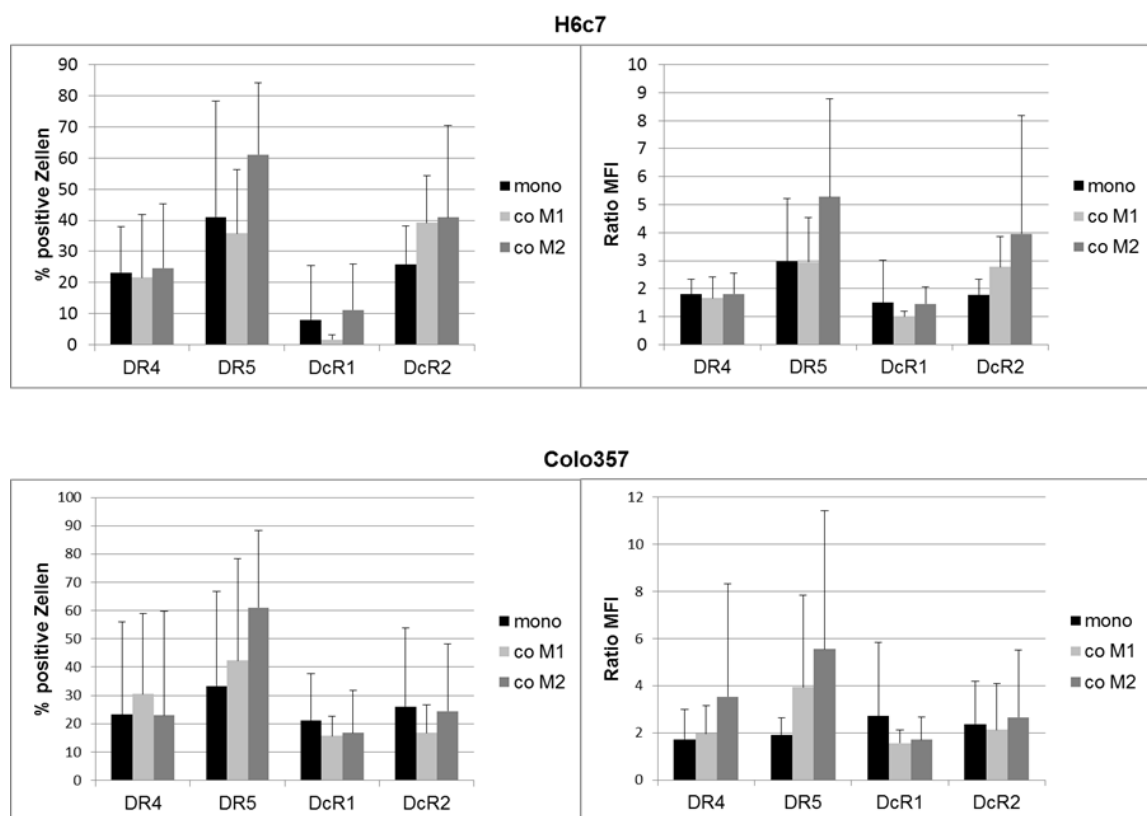
**Abbildung 4.31: In co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen ist nicht die Expression der Procaspase-3, aber deren Aktivierung durch TRAIL vermindert.** Ganzzelllysate von mono- (mono) und mit M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen, die entweder unbehandelt oder 24 Stunden mit TRAIL stimuliert worden waren, wurden im Westernblot auf die Expression der Gesamtmenge der Procaspase-3 (35 kDa) und Spaltung von Caspase-3 (19 kDa) untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3. Als Ladekontrolle wurde HSP90 detektiert.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass sowohl M1- als auch M2-Makrophagen zu einer Verminderung der Apoptosesensibilität gegenüber TRAIL in H6c7- und Colo357-Zellen führen, wobei dieser Effekt nicht durch eine verminderte Expression der Procaspase-3 erklärt werden kann, sich aber in einer verminderten Aktivierung von Caspase-3 äußert.

#### **4.3.2 Die TRAIL-Rezeptorexpression ist in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit Makrophagen weitgehend unverändert.**

Um die Ursache für die verminderte Aktivität von Caspase-3 und -7 nach TRAIL-Stimulation in H6c7- und Colo357-Zellen, die mit M1- oder M2-Makrophagen co-kultiviert worden waren, zu finden, wurde zunächst die TRAIL-Rezeptorexpression der Epithelzellen analysiert. Eine verminderte Expression der TRAIL-Rezeptoren 1 und/oder 2 (DR4 und 5) bzw. eine Hochregulation der *Decoy*-Rezeptoren TRAIL-Rezeptor 3 und/oder 4 (DcR1 und 2) wären eine Erklärung für die beobachteten Phänomene. Dafür wurde in mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen zum Zeitpunkt, an dem für die Caspas-3/7-Assays mit TRAIL stimuliert wurde (Tag 4), einerseits die Oberflächenexpression aller 4 Rezeptoren mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie, andererseits die Gesamtexpression in Ganzzelllysaten mittels Westernblot untersucht. **Abbildung 4.32** zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Dabei wurde sowohl der Anteil positiver Zellen, als auch der Median der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Rezeptordichte auf einzelnen Zellen betrachtet. Daraus ergaben sich die nachfolgenden Trends: Mono-kultivierte H6c7-Zellen zeigten eine durchschnittliche Basalexpression von DR4 auf ca. 20 %, von DR5 auf ca. 40 %, von DcR1 auf weniger als 10 % und von DcR2 auf ca. 25 % der Zellen. Colo357-Zellen zeichneten sich durch die Expression von DR4 auf ca. 20 %, DR5 auf ca. 30 %, DcR1 auf ca. 20 % und DcR2 auf ca. 25 % der Zellen aus. Die Rezeptordichte von DR4, DcR1 und DcR2 war in mono-kultivierten H6c7-Zellen ähnlich (Ratio MFI zwischen 1,5 und 2). Die Verteilungsdichte von DR5 war in diesen Zellen basal etwa doppelt so hoch (Ratio MFI von ca. 3). Colo357-Zellen wiesen nach Mono-Kultur vergleichbare Rezeptordichten von DR4 und DR5 (Ratio MFI ca. 2) und, leicht erhöht, von DcR1 und DcR2 (Ratio MFI 2-3) auf. Die Oberflächenexpression von DR4 und DcR1 blieb in beiden Zelllinien nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen weitgehend unbeeinflusst, sowohl in Bezug

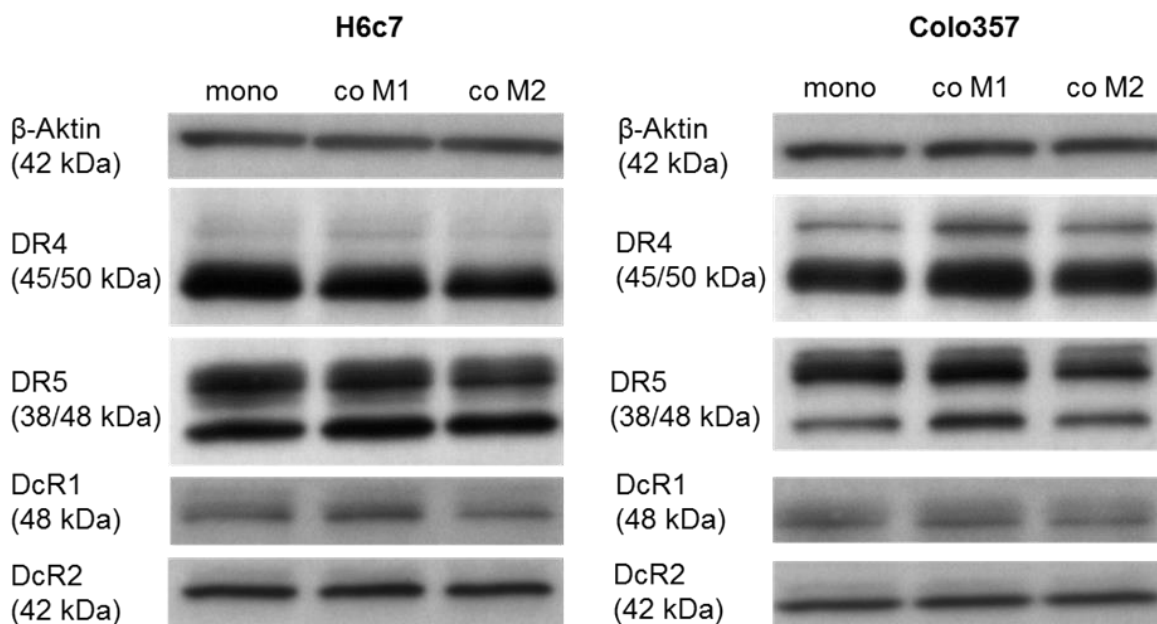
auf den prozentualen Anteil der positiven Zellen als auch der MFI. H6c7-Zellen zeigten allerdings eine Erhöhung des Anteils DR5-positiver Zellen und der Rezeptordichte nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen. In Colo357-Zellen waren ähnliche Trends sogar nach Co-Kultur mit sowohl M1- als auch M2-Makrophagen zu beobachten. H6c7-Zellen zeigten darüber hinaus eine Erhöhung des Anteils von Zellen mit Oberflächenexpression von DcR2 sowie erhöhter Expressionsdichte dieses Rezeptors nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen. In Colo357-Zellen zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht.



**Abbildung 4.32: Die Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptoren ist in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit Makrophagen weitgehend unverändert.** H6c7- und Colo357-Zellen wurden nach 4 Tagen Kultur in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) durchflusszytometrisch auf die Expression von DR4 und -5 sowie DcR1 und -2 untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SA des prozentualen Anteils positiver Zellen bzw. der Ratio der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI des spezifischen Antikörpers/MFI der Isotypenkontrolle) aus 5 unabhängigen Versuchen.

Aufgrund der großen Streuung der Daten der durchflusszytometrischen Analyse, die keine statistischen Signifikanzen aufwies, können diese Befunde lediglich als Trends gedeutet werden. Die tendenziell erhöhte Expression von DR5 nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen in diesen Zellen würde sogar eher für eine gesteigerte

Sensitivität gegenüber TRAIL sprechen, die sich in den Caspase-3/7-Assays nicht zeigte. Dies gilt auch für die H6c7-Zellen. Die tendenzielle Erhöhung der Oberflächenexpression von DcR2 nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen in diesen Zellen wäre eine mögliche Erklärung für die verminderte Caspase-3/7-Aktivität nach TRAIL-Stimulation. In der Westernblotanalyse ergaben sich hingegen weder in H6c7- noch in Colo357-Zellen, die mit M1- oder M2-Makrophagen co-kultiviert wurden, Veränderungen in der Gesamtmenge der exprimierten TRAIL-Rezeptoren DR4 und -5 sowie DcR1 und -2 zum Zeitpunkt der Stimulation mit TRAIL (Tag 4), verglichen mit der jeweiligen Mono-Kultur (**Abbildung 4.33**). In Zusammenschau der Daten aus Durchflusszytometrie und Westernblot kann eine unterschiedliche Rezeptorexpression als Ursache für das verminderte Ansprechen gegenüber TRAIL von H6c7- und Colo357-Zellen, die mit M1- und M2-Makrophagen co-kultiviert wurden, eher ausgeschlossen werden.

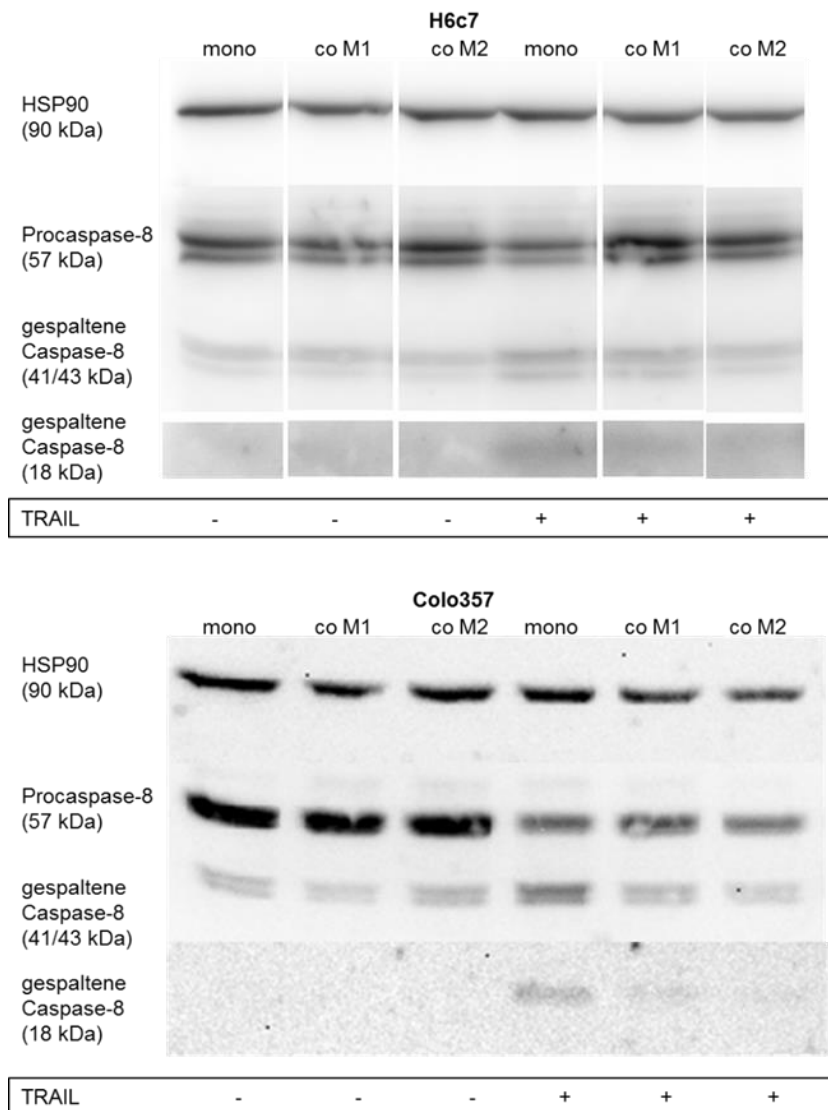


**Abbildung 4.33: *In vitro* polarisierte M1- und M2-Makrophagen beeinflussen nicht die Gesamtexpression von TRAIL-Rezeptoren in H6c7- und Colo357-Zellen.** In Ganzzelllysaten von H6c7- und Colo357-Zellen, die für 4 Tage in Abwesenheit (mono) oder Anwesenheit von M1- (co M1) oder M2-Makrophagen kultiviert worden waren, wurden DR4 und -5, DcR1 und -2 sowie β-Aktin, letzteres als Ladekontrolle, im Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 5.



#### **4.3.3 Caspase-8 wird nach Stimulation mit TRAIL in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen vermindert aktiviert.**

Da eine unterschiedliche TRAIL-Rezeptorexpression als Ursache für die Abnahme im Ansprechen auf TRAIL unter Co-Kulturbedingungen ausgeschlossen wurde, sollte als nächstes überprüft werden, ob dieser in co-kultivierten H6c7- und Colo357 beobachtete Effekt durch eine unterschiedliche Expression oder Aktivierung der Initiatorcaspase-8 erklärt werden kann. Der nach Aktivierung durch den Liganden an DR4 oder DR5 gebildete DISC-Komplex spaltet und aktiviert die Initiatorcaspase-8. Um zu überprüfen, ob die Basalexpression der Procaspase bzw. die Spaltung von Caspase-8 in H6c7- und Colo357-Zellen unter Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen moduliert wird, wurden Ganzzelllysate beider Epithelzelllinien aus Mono- bzw. Co-Kultur mit und ohne TRAIL-Stimulation für 24 Stunden mittels Westernblot untersucht. Dabei zeigte sich in keiner der beiden Zelllinien eine Veränderung der basalen Expression von Caspase-8 (Procaspase-8) unter Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen (**Abbildung 4.34**).



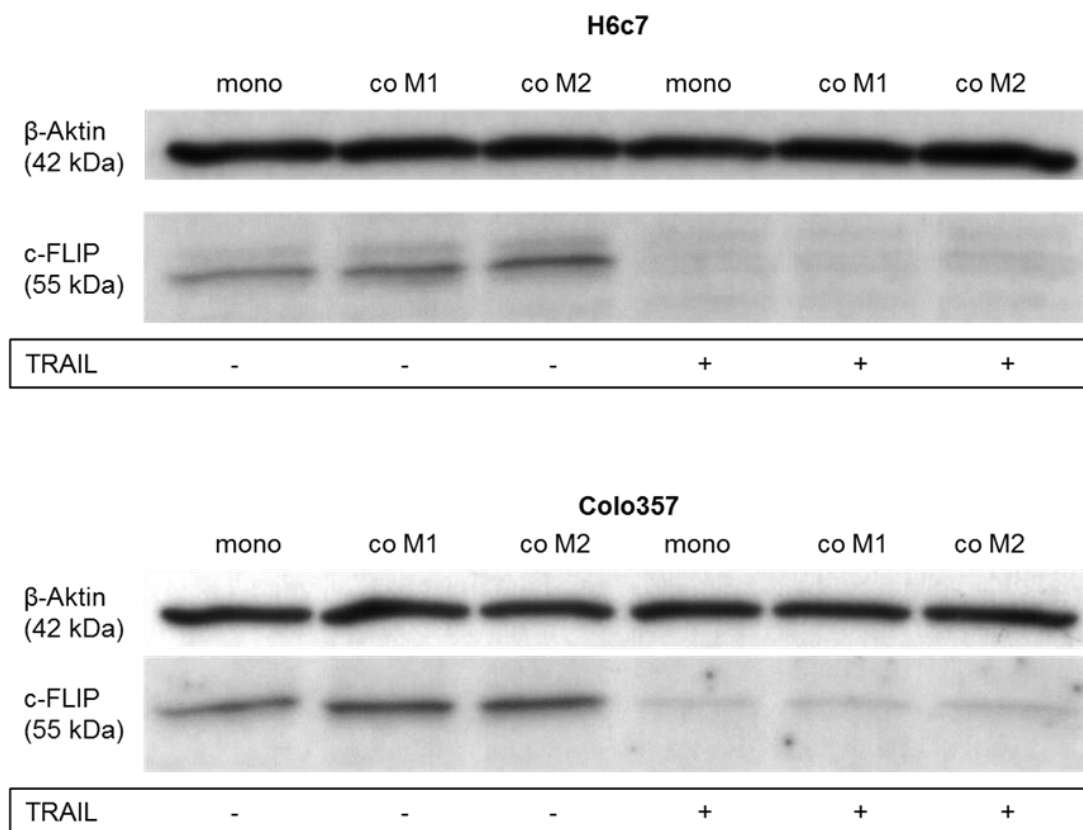
**Abbildung 4.34:** In co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen ist nicht die Expression der Procaspase-8, aber deren Aktivierung durch TRAIL vermindert. Ganzzelllysate von mono- (mono) und mit M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen, die entweder unbehandelt oder 24 Stunden mit TRAIL stimuliert worden waren, wurden im Westernblot auf die Expression der Gesamtmenge (57 kDa) und Spaltung von Caspase-8 (41/43 und 18 kDa) untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3. HSP90 wurde als Ladekontrolle detektiert.

Die Spaltung von Caspase-8 in das inaktive Fragment (41/43 kDa) und das aktive Fragment (18 kDa) nach Stimulation mit TRAIL war hingegen in beiden Zelllinien nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen stark vermindert (**Abbildung 4.34**)

Diese Daten weisen darauf hin, dass die abnehmende Sensibilität gegenüber TRAIL in H6c7- und Colo357-Zellen, die mit M1- oder M2-Makrophagen co-kultiviert wurden, bereits durch eine verminderte Aktivierung von Caspase-8 erklärt werden kann.

#### 4.3.4 Die Expression von c-FLIP ist in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen erhöht.

Eine mögliche Ursache einer verminderten Caspase-8-Aktivität ist eine Hochregulation des inhibitorischen Proteins c-FLIP, welches die Spaltung der Caspase-8 verhindert [125]. Um die Expression von c-FLIP in den Epithelzellen zu analysieren, wurden Ganzzelllysate von H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur für 5 Tage mit und ohne TRAIL-Stimulation für 24 Stunden im Westernblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von c-FLIP unter Co-Kultur mit M1- und stärker noch mit M2-Makrophagen in H6c7- und Colo357-Zellen erhöht war. Nach TRAIL-Stimulation war in allen Proben eine Reduktion der Menge von c-FLIP auf ein vergleichbar geringes Niveau zu detektieren, was durch die Spaltung von c-FLIP bei der Inhibition der Caspase-8-Aktivierung zu erklären ist. (**Abbildung 4.35**).

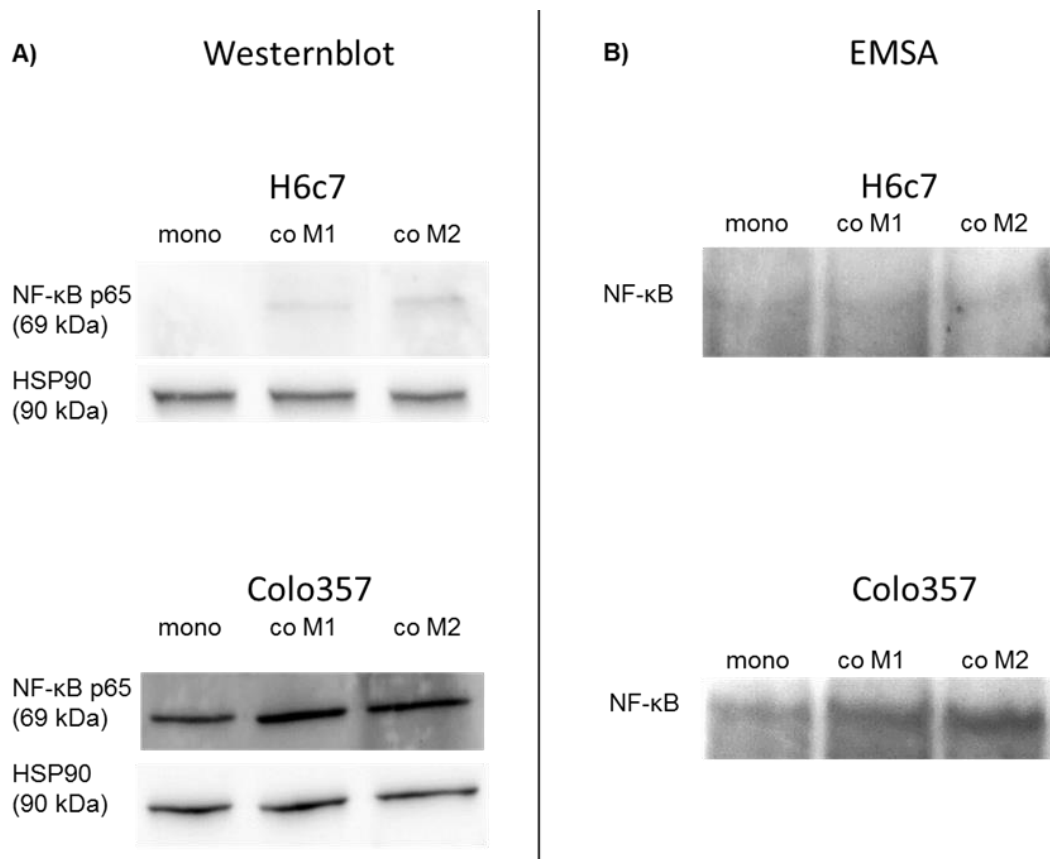


**Abbildung 4.35: Erhöhte Expression von c-FLIP in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.**

Ganzzelllysate von mono- (mono) und mit M1- (co M1) oder M2-Makrophagen (co M2) co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen, die entweder unbehandelt oder 24 Stunden mit TRAIL stimuliert worden waren, wurden im Westernblot auf die Expression von c-FLIP untersucht. Dabei wurde β-Aktin als Ladekontrolle detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 6.

#### 4.3.5 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen vermehrt aktiviert.

Die Expression von c-FLIP und weiterer apoptoserelevanter Gene wie Mitgliedern der Bcl-2- (z.B. Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>) und cIAP-Familien wird wesentlich durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert [128,153]. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Expression von c-FLIP in H6c7- und Colo357-Zellen, die mit M1- und M2-Makrophagen co-kultiviert wurden, durch eine vermehrte Aktivierung von NF- $\kappa$ B begründet werden kann, wurde zum einen die aktivierte, nicht mehr an ihren Inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$  bzw. - $\beta$  gebundene NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 im Westernblot detektiert und zum anderen die DNA-Bindung von kernständigem NF- $\kappa$ B mittels EMSA überprüft (**Abbildung 4.36 A und B**).



**Abbildung 4.36: Erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.** Kernextrakte von H6c7- und Colo357-Zellen, die für 5 Tage mono- (mono) oder mit M1- (co M1) bzw. M2-Makrophagen (co M2) kultiviert worden waren, wurden im Westernblot (**A**) und EMSA (**B**) auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hin untersucht. In **A** wurde die aktivierte, nicht mehr an I $\kappa$ B $\alpha$  gebundene p65-Untereinheit mit HSP90 als Ladekontrolle detektiert. **B** zeigt die autoradiographisch detektierte Bande des DNA-Protein-Komplexes. Es ist je eins von je 5 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Dabei zeigten sich eine erhöhte Expression der aktiven p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B sowie eine vermehrte DNA-Bindung des kernständigen Transkriptionsfaktors unter Co-Kultur mit sowohl M1- als auch M2-Makrophagen in H6c7-Zellen. Diese Effekte waren deutlich stärker in Colo357-Zellen zu beobachten, die bei beiden Nachweismethoden bereits eine basal höhere NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigten.

Insgesamt zeigen die Daten in **Kapitel 4.3**, dass M1- und M2-Makrophagen in indirekter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen eine Abnahme der Sensibilität gegenüber TRAIL vermitteln, was durch die erhöhte Expression von c-FLIP vermutlich über eine vermehrte Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu erklären ist.

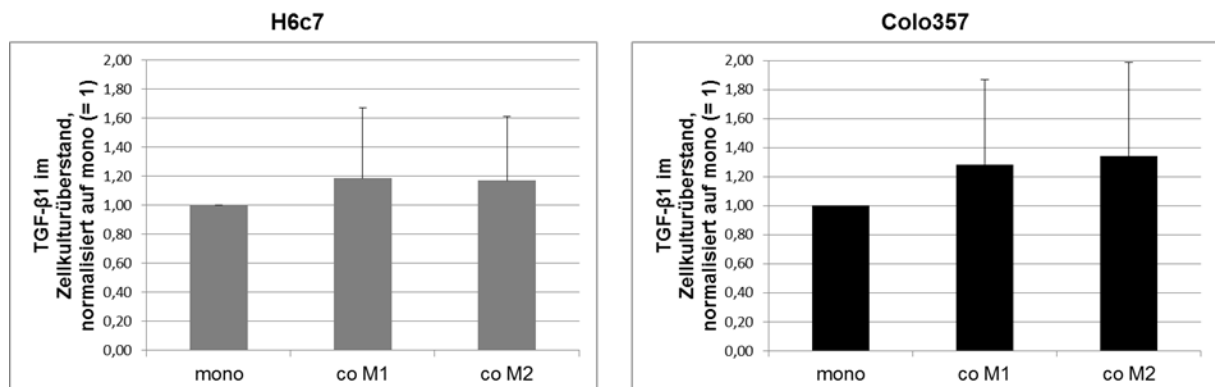
Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten nun die Faktoren gefunden werden, über die M1- und M2-Makrophagen die in **Kapitel 4.2** gezeigten EMT-assoziierten Veränderungen und die verminderte Apoptosesensitivität gegenüber TRAIL (**Kapitel 4.3**) in prämaligen und malignen Pankreasgangepithelzellen vermitteln.

#### **4.4 Veränderte Konzentrationen von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen aus Co-Kulturen von H6c7- bzw. Colo357-Zellen und M1- bzw. M2-Makrophagen**

Die beobachteten Effekte der verschiedenen Makrophagenpopulationen auf Morphologie, EMT-Markerexpression und Abnahme der Sensibilität gegenüber TRAIL von co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen sowie bei letzteren auch auf die Invasionsfähigkeit, müssen aufgrund des gewählten indirekten Co-Kultursystems ausschließlich auf löslichen Faktoren beruhen. Diese können entweder von den Makrophagen freigesetzt oder durch deren Anwesenheit in den Epithelzellen produziert und in den Überstand sezerniert werden. Umgekehrt können lösliche Faktoren, die von den Epithelzellen freigesetzt werden oder von Makrophagen in Anwesenheit von Epithelzellen sezerniert werden, als Ursache für die Repolarisation der M1-Makrophagen gesehen werden. Um diese Faktoren zu identifizieren, wurden Überstände von mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen mittels ELISA- und Bioplex-Assays untersucht. Dabei wurden wichtige Modulatoren der Makrophagendifferenzierung, namentlich IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF und GM-CSF [53] sowie das chemotaktisch auf Monozyten wirkende [154], Invasions- und Angiogenese-assoziierte IL-8/CXCL8 [155] detektiert. Außerdem wurden die Makrophagen rekrutierenden Chemokine MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 und MIP-1 $\beta$ /CCL4 sowie das pro-inflammatorische IL-12p70, die auch als Charakteristikum von M1-Makrophagen gelten [52], und die mit Invasion und Metastasenbildung assoziierten Faktoren MIF [156] und TNF- $\alpha$  [157] analysiert. Letzterer wurde auch mit Apoptoseresistenz durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Verbindung gebracht [134,158]. Des Weiteren wurde das Tumorprogression und Metastasenbildung im PDAC supprimierende Chemokin SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 [159], welches allerdings auch als M2-polarisierend beschrieben ist [160] sowie das mit Invasion von Tumorzellen in Verbindung gebrachte [161] und M1-Makrophagen-assoziierte Chemokin MIG/CXCL9 [52] untersucht. Zusätzlich wurden die für ihre Rolle in der inflammatorischen Karzinogenese bekannten Wachstumsfaktoren HGF und VEGF [162] sowie der auch EMT vermittelnde Faktor TGF- $\beta$ 1 [163] detektiert.

Die Detektion mittels ELISA zeigte eine erhöhte Konzentration von aktiviertem TGF- $\beta$ 1 in den Überständen von H6c7- und etwas stärker von Colo357-Zellen, die mit M1- und

M2-Makrophagen co-kultiviert worden waren im Vergleich zur jeweiligen Mono-Kultur (Abbildung 4.37).



**Abbildung 4.37: Erhöhte Spiegel von TGF-β1 im Zellkulturüberstand von co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.** Gezeigt ist die per ELISA detektierte Menge an aktiviertem TGF-β1 in den Überständen als n-faches von mono. Mittelwerte ± SA aus 5 unabhängigen Versuchen.

Alle weiteren untersuchten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wurden mittels Bio-Plex®-Assay in den Überständen von mono- und co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4.11** zusammengefasst und ergaben folgende Veränderungen der Konzentrationen der untersuchten Faktoren im Zellkulturüberstand von Co-Kulturen gegenüber der jeweiligen Mono-Kultur (Faktor der Konzentrationsänderung bezogen auf die Mono-Kultur in Klammern):

Co-Kulturen von H6c7-Zellen mit M1- bzw. M2-Makrophagen zeigten eine deutliche Erhöhung von MIG/CXCL9 (Faktor 218,7 bzw. 107,4), MIP-1α (Faktor 6,2 bzw. 1,4), MIP-1β/CCL4 (Faktor 218,6 bzw. 15), SDF-1α (Faktor 7,6 bzw. 3,9), MCP-1/CCL2 (Faktor nicht bestimmbar) und TNF-α (Faktor 8,3 bzw. 1,2). Dabei war die Konzentration im Zellkulturüberstand in Co-Kulturen von H6c7-Zellen mit M1-Makrophagen jeweils höher als mit M2-Makrophagen. Dieselben Co-Kulturen zeigten etwa ähnliche Erhöhungen der Konzentrationen von IFN-γ (Faktor 3 bzw. 1,8), IL-8/CXCL8 (Faktor 3,5 bzw. 2,2), IL-10 (Faktor 4,1 bzw. 3,9) und IL-12p70 (Faktor 1,6 bzw. 1,5). Die Konzentration von IL-13 war nur in Co-Kultur von H6c7-Zellen mit M1-Makrophagen erhöht (Faktor 3,8).

Co-Kulturen von Colo357-Zellen mit M1- bzw. M2-Makrophagen zeigten ebenfalls eine deutliche Erhöhung von MCP-1/CCL2 (Faktor 13,4 bzw. 6), MIG/CXCL9 (Faktor nicht bestimmbar), MIP-1α (Faktor 6,9 bzw. 1,4) und MIP-1β/CCL4 (Faktor 430,85 bzw.

26,8). Dabei war die Konzentration im Zellkulturüberstand auch in Co-Kulturen von Colo357-Zellen mit M1-Makrophagen jeweils höher als mit M2-Makrophagen. Eine etwa gleiche Konzentrationserhöhung zeigten IL12-p70 (Faktor 1,5 bzw. 1,2) und MIF (Faktor 1,3 bzw. 1,4) im Zellkulturüberstand aus Co-Kulturen von Colo357-Zellen und M1- bzw. M2-Makrophagen. Erniedrigt unter Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen war die Konzentration von IFN- $\gamma$  (Faktor 0,6 für M1 bzw. 0,8 für M2) und IL-4 (Faktor 0,8 für M1 und 0,6 für M2). Unter Co-Kultur von Colo357-Zellen mit M1-Makrophagen erhöht und mit M2-Makrophagen erniedrigt war die Konzentration von IL-8/CXCL8 (Faktor 1,5 bzw. 0,4) und TNF- $\alpha$  (Faktor 3,3 bzw. 0,8).

Nicht gezeigt sind die Messwerte von GM-CSF, M-CSF, HGF und VEGF. GM-CSF war in keiner der untersuchten Proben detektierbar. M-CSF war zwar in Mono- und Co-Kulturen von H6c7- und Colo357 Zellen zu detektieren, allerdings unter großen Schwankungen der Konzentration zwischen den beiden untersuchten Experimenten und ohne erkennbaren Trend. Auch HGF und VEGF konnten in Kulturen von H6c7- und Colo357-Zellen in An- und Abwesenheit von M1- und M2-Makrophagen zwar detektiert werden, allerdings ebenfalls mit starken Schwankungen der Konzentrationen zwischen beiden Versuchen. Tendenziell war zu erkennen, dass VEGF bereits in Mono-Kulturen von H6c7- und Colo357-Zellen in ähnlichen Konzentrationen wie unter Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen vorhanden war (Konzentrationen zwischen 290 und 2600 pg/ml), während HGF vermehrt in den Co-Kulturen von beiden Epithelzelllinien mit beiden Makrophagenpopulationen zu detektieren war.



**Tabelle 4.11: Veränderte Spiegel von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen von H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen.** Per Bioplex-Analyse detektierte Mengen der angegebenen Analyten von mono- (mono) und mit M1- (co M1) und M2-Makrophagen (co M2) co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte von 2 unabhängigen Versuchen, angegeben in pg/ml sowie als n-Faches bezogen auf die jeweilige Mono-Kultur in Klammern. Die farbliche Hinterlegung zeigt eine tendenziell erhöhte (grün) oder erniedrigte (rot) Menge des Analyten in der Co-Kultur bezogen auf die jeweilige Mono-Kultur an. nm = nicht möglich, da Bezugsgröße 0; x = nicht auswertbar, da kein einheitlicher Trend in den biologischen Replikaten.

Analyt	H6c7			Colo357		
	mono	co M1	co M2	mono	co M1	co M2
IFN- $\gamma$	0,97	2,89 (3)	1,73 (1,8)	6,59	3,75 (0,6)	5,15 (0,8)
IL-4	x	x	x	0,43	0,34 (0,8)	0,25 (0,6)
IL-8/CXCL8	1426,12	5005,04 (3,5)	3086,92 (2,2)	7181,55	10764,13 (1,5)	3026,52 (0,4)
IL-10	0,13	0,53 (4,1)	0,51 (3,9)	x	x	x
IL-12p70	2,41	3,9 (1,6)	3,71 (1,5)	3,7	5,43 (1,5)	4,35 (1,2)
IL-13	0,26	0,98 (3,8)	0,245 (1,0)	0,32	1,03 (4,1)	0,31 (1,0)
MCP-1/CCL2	0	495,43 (nm)	408,76 (nm)	64,34	862,60 (13,4)	385,31 (6)
MIF	x	x	x	6739,64	9031,36 (1,3)	9525,08 (1,4)
MIG/CXCL9	51,44	11249,32 (218,7)	5523,46 (107,4)	0	23851,79 (nm)	33138,71 (nm)
MIP-1 $\alpha$ / CCL3	1,83	11,32 (6,2)	2,54 (1,4)	1,82	12,56 (6,9)	2,63 (1,4)
MIP-1 $\beta$ / CCL4	1,17	255,72 (218,6)	17,53 (15)	0,4	172,34 (430,85)	10,72 (26,8)
SDF-1 $\alpha$ / CXCL12	104,1	796,13 (7,6)	410,84 (3,9)	x	x	x
TNF- $\alpha$	2,19	18,24 (8,3)	2,64 (1,2)	5,9	19,7 (3,3)	4,6 (0,8)

Die erhöhte Konzentration von aktiviertem TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturüberstand von H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen bzw. von TNF- $\alpha$  nach Co-Kultur vor allem mit M1-Makrophagen können aufgrund ihrer bekannten Rolle in EMT bzw. Apoptoseresistenz als Ursache für die unter **Kapitel 4.2** und **4.3** beschriebenen Effekte in Frage kommen. Daher wird derzeit der Einfluss der Inhibition von TGF- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  auf die von M1- und M2-Makrophagen vermittelten Veränderungen in H6c7- und Colo357-Zellen im Labor weiter untersucht.

## 5. Diskussion

Tumor-assoziierte Makrophagen sind ein wesentlicher Bestandteil der entzündlichen Tumormikroumgebung [24] und werden in den meisten Fällen dem anti-inflammatorischen M2-Phänotyp zugeordnet [53]. Dabei wird eine erhöhte Zahl von TAMs in vielen Krebserkrankungen mit kürzeren Überlebenszeiten der Patienten assoziiert [73], so auch im duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) [79], wobei PDAC assoziierte Makrophagen bisher nicht umfassend charakterisiert wurden.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Prävalenz unterschiedlicher Makrophagenpopulationen in CP und PDAC immunhistochemisch untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die am weitesten verbreitete binäre Unterscheidung von Makrophagen in M1- und M2-Phänotyp. Weiterführend wurde eine Charakterisierung von PDAC assoziierten Makrophagen bezüglich der Expression von Phänotyp-spezifischen Oberflächenproteinen und Zytokinen, vergleichend mit *in vitro* generierten Makrophagen mit polarisiertem M1- bzw. M2-Phänotyp durchgeführt. In der Zusammenschau deuten die Ergebnisse der Analysen auf einen gemischten Phänotyp der TAMs hin, der sowohl M1- (HLA-DR<sup>hoch</sup>, CD16<sup>niedrig</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>hoch</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>hoch</sup>) als auch M2-Charakteristika (CD163<sup>hoch</sup>, IL-10<sup>hoch</sup>) aufweist, und der Übereinstimmungen mit den in chronischen Pankreatitiden detektierten Makrophagen zeigt. Diese Befunde werden in **Kapitel 5.1** diskutiert und stehen in Beziehung zur beobachteten Modulation des Phänotyps von *in vitro* generierten Makrophagen unter Co-Kultur (diskutiert in **Kapitel 5.2**)

Um herauszufinden, welchen Beitrag Makrophagen zur Entstehung und Progression des PDACs leisten und ob dieser Beitrag auf pro- und/oder anti-inflammatorischen Eigenschaften beruht, wurden *in vitro* Co-Kulturexperimente durchgeführt. Als Modell des Pankreasgangepithels wurden dabei die prä-maligne Zelllinie H6c7 zur modellhaften Untersuchung der Phänomene zu Beginn der Tumorentstehung und die maligne Zelllinie Colo357 als Modell für die Effekte später in der Tumorentstehung des PDAC gewählt. Diese Zelllinien wurden einer indirekten Co-Kultur mit PDAC assoziierten Makrophagen oder *in vitro* generierten M1- bzw. M2-Makrophagen ausgesetzt und hinsichtlich Tumor-assoziierten Veränderungen im EMT-Status und im Ansprechen auf Apoptosestimulanzen untersucht. Dabei zeigte sich unter allen Co-Kulturbedingungen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Induktion von EMT

(diskutiert in **Kapitel 5.3**) sowie eine herabgesetzte Sensibilität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (diskutiert in **Kapitel 5.4**) in beiden Epithelzelllinien.

Da die Versuche in einem indirekten Co-Kultursystem durchgeführt wurden, wurde die Ursache für die beobachteten Effekte unter den in den Zellkulturüberstand sezernierten löslichen Faktoren gesucht. Aus einer Reihe von Faktoren, die in Co-Kulturen von Makrophagen und Epithelzellen in erhöhten Konzentrationen verglichen mit Überständen von mono-kultivierten Epithelzellen vorlagen, wurden dabei TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$  als die wahrscheinlichsten Kandidaten identifiziert.

Insgesamt untermauern die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse die Theorie, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in der Entstehung des PDACs sowie in der Progression des PDACs spielen. Anders als bisher angenommen geschieht dies jedoch nicht ausschließlich über die anti-inflammatorischen und Wachstumsfördernden Eigenschaften von M2-polarisierten Makrophagen, sondern auch durch die pro-inflammatorischen Eigenschaften von M1-Makrophagen bzw. durch pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften von Makrophagen mit einem gemischten Phänotyp. Makrophagen stellen also eine vielversprechende Zielstruktur dar, um die Behandlung von Tumorpatienten zu verbessern. Daher werden abschließend Therapieansätze für das PDAC mit TAMs als Ziel in **Kapitel 5.5** diskutiert.

## 5.1 Charakterisierung von Makrophagen in CP und PDAC

In dieser Arbeit wurden Präparate von 42 PDACs und 15 CPs immunhistochemisch gefärbt und miteinander verglichen (**Kapitel 4.1**). Dabei wurde festgestellt, dass Makrophagen im Durchschnitt in größeren Mengen in chronischen Pankreatitiden vorkommen als in PDACs, wobei sie in letzteren zur Akkumulierung am malignen Epithel neigen. Es fiel außerdem auf, dass sowohl in den PDACs als auch in den CPs die über die Morphologie und die Positivität für den allgemeinen Makrophagenmarker CD68 identifizierten Makrophagen zu fast 100 % deckungsgleich in Anzahl und Verteilung mit Zellen waren, die eine Positivität für den M2-Phänotyp-assoziierten *Scavenger*-Rezeptor CD163 aufwiesen. Da die Präparate seriell geschnitten waren und die auf CD68 und CD163 gefärbten Schnitte daher nur wenige Mikrometer voneinander entfernt waren, konnte unter der Prämisse, dass alle Makrophagen CD68+ sind, davon ausgegangen werden, dass nahezu alle Makrophagen in den untersuchten Geweben auch CD163+ waren. In den CPs vermehrt, aber auch in den PDACs konnten zudem HLA-DR+ Makrophagen gefunden werden. Unter Berücksichtigung des Befundes, dass alle in diesem Kollektiv detektierten Makrophagen CD163+ waren, musste von einer Doppelpositivität der Makrophagen für CD163 und HLA-DR, und damit von einem gemischten Phänotyp aus M1- und M2-Makrophagen ausgegangen werden [63]. Diese Befunde konnten mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung auf CD163 und HLA-DR in Kryogeweben von PDACs (Daten nicht gezeigt) und der durchflusszytometrischen Analyse der frisch isolierten TAMs aus PDAC-Geweben bestätigt werden. **Tabelle 4.9** zeigt, dass durchschnittlich 23.2 % der untersuchten TAMs dreifach positiv für CD68, CD163 und HLA-DR waren. Für einen gemischten Phänotyp der TAMs sprach auch die niedrige Expression des M2-assoziierten CD16, die der von *in vitro* generierten M1-Makrophagen gleich (**Tabelle 4.9 und 4.10**), in Kombination mit der erhöhten Expression der M1-assoziierten Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie des M2-assoziierten IL-10 (**Abbildung 4.5**).

Beim Vergleich zwischen der TAM-Charakterisierung mittels Immunhistochemie (**Kapitel 4.1**) und Durchflusszytometrie (**Kapitel 4.2.1**) sind allerdings auch Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen zu beachten. Während im Kollektiv der immunhistochemisch gefärbten PDACs nahezu 100 % aller Makrophagen als CD163+ bestimmt wurden (**Abbildung 4.2 A**), lag der Anteil von CD163+ Zellen unter den frisch

isolierten PDAC assoziierten Makrophagen nur bei durchschnittlich 22,1 % (**Tabelle 4.9**). Eine weitere Diskrepanz gab es bei der Detektion von HLA-DR. Während der Anteil der HLA-DR+ Makrophagen in den immunhistochemisch gefärbten PDACs stets kleiner war als die der CD68+ Zellen, lag er bei der durchflusszytometrischen Analyse der TAMs bei durchschnittlich 84,5 % (**Tabelle 4.9**). Der Unterschied zwischen den Messwerten für HLA-DR kann durch die bessere Visualisierung von Intensitätsunterschieden bei der Durchflusszytometrie erklärt werden. Dabei werden sehr schwache Signale vom Laser des FACS erkannt, die vom menschlichen Auge bei der Auswertung der Gewebeschnitte nicht erfasst werden können, was zu höheren Anteilen positiver Zellen bei der FACS-Analyse führen kann. Der mittels Durchflusszytometrie detektierte niedrigere Anteil von CD163+ Makrophagen in den frisch isolierten PDAC assoziierten Makrophagen kann auf diese Weise nicht erklärt werden. Mögliche Ursachen hierfür wären die Verwendung unterschiedlicher Antikörper gegen CD163 bei beiden Methoden oder Unterschiede in den Patientenkollektiven.

Für die meisten Krebserkrankungen ist für TAMs ein M2-ähnlicher Phänotyp dokumentiert [40,53,63,164]. In manchen Tumoren, z.B. Brustkrebs, sind jedoch Mischpopulationen von Makrophagen bereits beschrieben [165], wobei auch der Einfluss von M1-assoziierten Charakteristika auf die Tumorprogression zunehmend beachtet wird [166].

Die wenigen bisher publizierten Arbeiten zur Charakterisierung von Makrophagen im PDAC berufen sich auf die o.g. Aussagen zum M2-Phänotyp von TAMs durch renommierte Arbeitsgruppen wie Mantovani *et al.*, und definieren den Phänotyp der PDAC assoziierten Makrophagen über einen oder zwei M2-assoziierte Marker, obwohl Makrophagen aus PDACs in den zitierten Arbeiten nie explizit genannt werden [79–82]. Kurahara *et al.* führten 2009 als erste eine Studie durch, die den Phänotyp von TAMs im PDAC mittels immunhistochemischer Färbungen untersuchte [79]. Sie detektierten diese über CD68 und CD163 oder CD204, jedoch ohne Berücksichtigung von M1-assoziierten Markern, und definierten sie als rein M2-phänotypisch, obwohl eine eventuell vorhandene Mischform so nicht ausgeschlossen werden konnte. In der darauffolgenden Arbeit reduzierte dieselbe Arbeitsgruppe die zur Identifikation von TAMs im PDAC verwendeten Marker auf ausschließlich CD163 [80]. Yoshikawa *et al.* verwendeten in ihrer Arbeit CD68 und CD204 zur Identifikation von

TAMs/Makrophagen in PDACs und CPs, ebenfalls ohne einen M1-Marker zu bestimmen [82]. Dabei detektierten sie mehr CD204+ Makrophagen in PDACs als in CPs, wobei die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit einer automatischen Software zur Flächenerkennung durchgeführt wurde. In den beispielhaften Aufnahmen der CD204-Färbung und dem darauf gekennzeichneten ausgewerteten Bereich sind dabei gefärbte Strukturen deutlich zu erkennen, die in der vorliegenden Arbeit bei der Auswertung der Färbungen von CD68 und CD163 aufgrund ihrer Morphologie als Fibroblasten identifiziert wurden und nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden (siehe **Kapitel 4.1**). Vor dem Hintergrund des in dieser Arbeit festgestellten höheren Anteils von Fibroblasten am Stroma von PDACs als an dem von CPs wäre eine versehentliche Wertung von CD204+ Fibroblasten als Makrophagen eine Erklärung für den in den PDACs erhöhten Makrophagenanteil in der Arbeit von Yoshikawa *et al.* [82]. Die einzige bisher veröffentlichte Studie, die neben den M2-assoziierten Markern CD163 und CD204 parallel auch CD68/HLA-DR+ Zellen als M1-Makrophagen im PDAC betrachtet, stammt von Ino *et al.*, wobei hier neben PDACs auch aus IPNMs hervorgegangene Tumore untersucht wurden, ohne zwischen den beiden Erkrankungen zu differenzieren [81]. Die Gruppe entdeckte eine erhöhte Zahl an CD163+ oder CD204+ Makrophagen in den untersuchten Tumorarealen, die aufgrund der Präsenz von Tumorzellen und erhöhter Leukozyteninfiltration ausgewählt wurden. Zusätzlich wurden in Bereichen ohne invasive Tumorzellen, die als chronische Pankreatitis definiert wurden, vermehrt CD68+/HLA-DR+ Zellen detektiert. Obwohl die Unterscheidung von PDAC und CP offenbar in beiden Arbeiten anders erfolgte, stehen diese Befunde nicht im Gegensatz zu der erhöhten Anzahl von CD163+ Makrophagen und der deutlich niedrigeren Prävalenz von HLA-DR+ Makrophagen in Tumornähe, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind (**Tabelle 4.5**) und könnten dasselbe Phänomen beschreiben.

Eine Analyse der TAMs über die Immunhistochemie hinaus, vor allem hinsichtlich der Expression verschiedener Zytokine, die für die exakte Charakterisierung ihres Phänotyps unerlässlich ist [54,55,167], wurde jedoch in keiner der oben genannten Arbeiten durchgeführt. Allerdings wurde in 3 der Studien eine Korrelation von erhöhter Makrophagenpräsenz im PDAC-Gewebe mit einer verkürzten Überlebensdauer der Patienten mittels Kaplan-Meyer-Berechnung gezeigt. Dabei wurde die vermehrte Anwesenheit von CD204+ Makrophagen [82] bzw. CD163+ oder CD204+ Makrophagen [79,81] signifikant mit kürzerer und die vermehrte Anwesenheit von

CD68/HLA-DR+ Makrophagen mit längerer Überlebenszeit korreliert [81]. In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen keine Korrelation von Makrophagenanzahl und/oder -lokalisation mit dem Überleben der Patienten festgestellt werden, was zwei mögliche Ursachen haben kann: Einerseits waren die in den drei o.g. Studien die Patientenkollektive wesentlich größer (76 bis 212 Patienten), was die Wahrscheinlichkeit einer signifikanten Korrelation erhöht. Und andererseits wurden in allen drei Arbeiten, im Gegensatz zur hier vorliegenden, Tumore mit unterschiedlichen Stadien untersucht. Dabei wurden sowohl kleinere und weniger invasive sowie größere Tumore mit Fernmetastasen miteinander verglichen. Vor allem der Einbezug von fernmetastasierten Karzinomen in die Analyse mag einen großen Einfluss auf das Überleben der Patienten, verglichen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Kollektiv von ausschließlich T3N1M0-Patienten, gehabt haben. Die Befunde dieser Arbeit deuten darauf hin, dass TAMs innerhalb dieses Kollektivs keine prognostische Bedeutung haben.



## 5.2 Makrophagenplastizität

Wie in **Kapitel 4.2.6** beschrieben wiesen *in vitro* generierte M1-Makrophagen nach 5 Tagen Co-Kultur mit H6c7- und stärker noch mit Colo357-Zellen einen veränderten Phänotyp auf. Dieser äußerte sich in einer weniger kugelförmigen Morphologie ohne die für M1-Makrophagen charakteristische Clusterbildung, einem Anstieg der M2-assoziierten Oberflächenmarker CD16 und CD163 sowie der M2-assoziierten Zytokine IL-10 und tendenziell TGF- $\beta$ . Diese Annäherung an den M2-Phänotyp ging interessanterweise auch mit einer vermehrten Expression der M1-typischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  einher. Die Bio-Plex®-Analyse (**Kapitel 4.4**) zeigte zudem einen Anstieg der M1-assoziierten Chemokine CCL2, -3 und -4 und CXCL9 [52] sowie IL-12 im Überstand von M1-Makrophagen, die mit H6c7- oder Colo357-Zellen co-kultiviert wurden. Dabei waren die Effekte im Falle von CCL2, CXCL9 und IL-12 stärker unter Co-Kultur mit Colo357-Zellen, von CCL4 stärker unter Co-Kultur mit H6c7-Zellen und von CCL3 vergleichbar in beiden Co-Kulturen. Auffällig war, dass auch in Überständen aus Co-Kulturen von M2-Makrophagen mit H6c7- bzw. Colo357-Zellen die Konzentrationen von CCL3 und IL-12 leicht, von CCL4 deutlich und von CCL2 und CXCL9 massiv erhöht waren, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die M2-Makrophagen M1-assoziierte Charakteristika annahmen, obwohl sie unter Co-Kultur eine unverändert hohe Expression der M2-assoziierten Oberflächenmarker CD16 und CD163 aufweisen (**Abbildung 4.19**). Es war nicht festzustellen, ob die genannten Zytokine und Chemokine von den Makrophagen sezerniert wurden oder als Effekt der Co-Kultur von den Epithelzellen, welche in Mono-Kultur vergleichsweise geringe Mengen dieser Faktoren freisetzen. Diese Frage könnte mittels rtPCR geklärt werden und ist für die Zukunft geplant. Dennoch können diese Beobachtungen neben der gesteigerten Expression der M1-assoziierten Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  (**Abbildung 4.20**) als weiteres Indiz für eine verstärkte Ausprägung von M1-Charakteristika, parallel zu der Entwicklung von M2-assoziierten Eigenschaften in den M1-Makrophagen unter Co-Kultur, gedeutet werden. Die Daten geben auch Hinweise auf eine Veränderung des Phänotyps der M2-Makrophagen unter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen mit der Ausbildung von M1-Charakteristika und untermauern insgesamt die Annahme, dass Makrophagen in Gegenwart von Pankreasgangepithelzellen einen Mischphänotyp annehmen (siehe auch Analyse der TAMs mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie, **Kapitel 4.1** und **4.2.1**).

Aus den Ergebnissen der Bio-Plex®-Analyse lassen sich auch Erklärungen für einen Teil der beobachteten Modifikationen des Makrophagenphänotyps ableiten. So könnte die Ausprägung der M2-Charakteristika in M1-Makrophagen unter Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen durch den Anstieg der Konzentration des M2-polarisierenden Faktors IL-13 und/oder der Anwesenheit von M-CSF (Daten nicht gezeigt) im Überstand der jeweiligen Co-Kultur bedingt sein. Für eine parallele Verstärkung bzw. Ausprägung der M1-Polarisation in den M1- bzw. M2-Makrophagen spricht nur die leicht erhöhte Konzentration von IFN- $\gamma$  unter Co-Kultur mit H6c7-Zellen. Weitere M1-polarisierende Faktoren wie GM-CSF konnten nicht detektiert werden. Möglicherweise ist für die o.g. Effekte jedoch auch ein weiterer, bisher nicht beschriebener M1-polarisierender Faktor verantwortlich.

Die beobachtete Verschiebung des Phänotyps der M1-Makrophagen unter Co-Kultur mit Pankreasgangepithelzellen passt zu dem in der Literatur beschriebenen Phänomen der Verschiebung des Phänotyps von Makrophagen bei der Entstehung von Tumoren aus chronischen Entzündungen [160,168–172]. Hierbei werden als Mechanismen die vermehrte Produktion von M2-polarisierendem PGE2 durch entzündungsbedingt induzierte Cyclooxygenase-2 (COX2) [169], eine defekte NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion durch erhöhte Expression des inhibitorischen p50-Homodimers in den Makrophagen [170], ein negativer Feedback-Mechanismus in der als M1-polarisierend beschriebenen, allerdings Zell-Zell-Kontakt abhängigen Notch-Signaltransduktion [171] sowie die zunehmend steigende Produktion von M2-polarisierenden löslichen Faktoren wie CXCL-12 und M-CSF im Verlauf der Karzinogenese genannt [160,172]. Überträgt man die in dieser Arbeit gewählten Co-Kulturmodelle von Makrophagen mit prä-malignen H6c7- bzw. malignen Colo357-Zellen auf die *in vivo* Situation in chronischer Pankreatitis bzw. PDAC, so könnten TGF- $\beta$ , CXCL12 und M-CSF als Makrophagen repolarisierende Faktoren in der CP und TGF- $\beta$  und M-CSF als Stabilisatoren des veränderten Phänotyps im PDAC in Frage kommen. Tiefergehende Analysen von Signalwegen wie dem von NF- $\kappa$ B in den Makrophagen wurden in dieser Arbeit aufgrund des limitierten Zellmaterials bisher nicht durchgeführt, sind jedoch als weiterführende Untersuchungen geplant.

### 5.3 Der Einfluss von verschiedenen Makrophagenpopulationen auf die EMT und Invasion von Pankreasgangepithelzellen.

Mit den *in vitro* Co-Kulturen von TAMs, M1- bzw. M2 Makrophagen und H6c7- bzw. Colo357-Zellen konnte in beiden Epithelzelllinien die Ausbildung einer spindelförmigen Morphologie sowie eine Induktion von L1CAM und Vimentin nach Co-Kultur mit allen drei Makrophagenpopulationen und die Translokation von E-Cadherin nach M1- und M2-Co-Kultur gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Induktion von Snail nach M1-Co-Kultur und die Induktion von Slug nach M2-Co-Kultur in H6c7- und Colo357-Zellen (**Kapitel 4.2**) sowie die erhöhte Invasivität von Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M2-, aber vor allem mit M1-Makrophagen demonstriert. Diese Daten unterstreichend zeigte die immunhistochemische Analyse der PDAC-Gewebeschnitte (**Kapitel 4.1**) den Trend einer sich zunehmend verändernden Zusammensetzung des Stromas in PDACs mit zunehmendem Dedifferenzierungsgrad (Grading) der Tumorzellen (**Tabelle 4.6**). Dieser Befund kann auch als progressive Dedifferenzierung der Tumorzellen, z.B. durch EMT, unter dem Einfluss eines zunehmend ausgeprägten Stromas interpretiert werden. Dafür spricht auch der signifikante Zusammenhang zwischen einer hohen Dichte an Makrophagen (CD68/CD163+) im Gewebe der PDACs mit einer vermehrten Expression von Vimentin sowie zwischen ihrer tumornahen Lokalisation und der Expression von L1CAM im malignen Epithel der PDACs (Daten nicht gezeigt, da Bestandteil der Doktorarbeiten von L. Goebel und R. Mennrich aus der Arbeitsgruppe).

Die oben genannten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen [173–175]. So konnten Bonde *et. al* beispielsweise die Induktion von EMT in Teratokarzinomzellen *in vivo* in Mäusen durch TAMs und *in vitro* durch IL-4/IL-13-polarisierte M2-Makrophagen zeigen [173] und als Ursache dafür den TGF- $\beta$  abhängig aktivierten  $\beta$ -Catenin-Signalweg identifizieren. Die EMT-Induktion *in vitro* äußerte sich dabei in der Reduktion der E-Cadherinexpression, erhöhter Expression von Vimentin und Fibronectin sowie gesteigertem Invasionsvermögen der untersuchten Tumorzellen. Eine erhöhte Menge an TGF- $\beta$ 1 konnte in der vorliegenden Arbeit auch in Überständen der Co-Kulturen von M2-Makrophagen mit H6c7- bzw. Colo357-Zellen detektiert werden (**Abbildung 4.37**), ebenso in Co-Kulturen dieser Epithelzelllinien mit M1-Makrophagen, wenngleich weniger prominent. Der  $\beta$ -Catenin-Signalweg wurde dabei jedoch noch nicht untersucht. Weitere in Frage

kommende, TGF- $\beta$  aktivierte Signalwege mit bekannter Auswirkung auf die Expression EMT-relevanter Gene sind die Smad-Signaltransduktion und die MAPKinase-Wege. Zunächst ist jedoch eine Bestätigung der TGF- $\beta$ -Abhängigkeit der beobachteten Effekte auf die EMT-Induktion in den Pankreasgangepithelzellen geplant. Die zum Teil schwächeren Effekte auf die Morphologie sowie die Expression von E-Cadherin und L1CAM von H6c7- und Colo357-Zellen, die durch M1-Makrophagen vermittelt wurden, lassen sich ebenfalls durch eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ 1 erklären (**Abbildung 4.20** und **4.37**). M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp nach GM-CSF-Stimulation zeigten jedoch keine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression unter Co-Kultur (Daten nicht gezeigt). Dennoch waren auch unter Co-Kultur mit dieser Makrophagenpopulation EMT-assoziierte Veränderungen der Morphologie, eine verminderte Membranständigkeit von E-Cadherin und eine vermehrte Expression von L1CAM, Vimentin und Snail in H6c7- und Colo357-Zellen sowie eine erhöhte Invasion von Colo357-Zellen zu beobachten. Die Erhöhung der Expression von Vimentin und Snail sowie die Steigerung der Invasionsfähigkeit nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen mit stabilem pro-inflammatorischen Phänotyp waren sogar stärker ausgeprägt als nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen. Die Expression von TGF- $\beta$  alleine begründet diese Beobachtungen daher nicht ausreichend, diese müssen noch auf anderen Faktoren und/oder Mechanismen beruhen.

Eine Studie, in der die Auswirkungen des Kulturüberstands von murinen, LPS-aktivierten M1-Makrophagen auf murine Nierentubulusepithelzellen untersucht wurden [174], zeigt eine EMT-Induktion in den Epithelzellen durch Makrophagen sezerniertes MMP-9, über die es durch Spaltung von E-Cadherin zur Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges kommt. Eine Erhöhung der MMP-9-Expression konnte in dieser Arbeit auch in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen festgestellt werden (**Abbildung 4.17**). Es wurde jedoch nicht deren Aktivität bestimmt, was ein Ziel weiterer Untersuchungen darstellt. Die Detektion von MMP-9 in den Makrophagen steht ebenfalls noch aus. Die gesteigerte Invasionsfähigkeit von Colo357-, nicht aber H6c7-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen (**Abbildung 4.16**) lässt sich ebenfalls teilweise durch die Expression von MMPs in den Epithelzellen erklären. Die Menge exprimierter MMP-2 ist in Colo357-Zellen um ein vielfaches höher als in H6c7-Zellen. Nach Co-Kultur mit M1- und M2- Makrophagen kommt es in Colo-357 zur Induktion von MMP-2, MMP-9 wird jedoch nur nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen verstärkt exprimiert. Diese Beobachtung passt zu dem

Befund, dass Colo357- im Gegensatz zu H6c7-Zellen nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen verstärkt durch eine Kollagen-I-Matrix invadieren, jedoch verstärkt nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen.

Eine weitere Erklärung für die von M1-Makrophagen verstärkt geförderte Invasionsfähigkeit von Colo357-Zellen liefert die im Überstand dieser Co-Kulturen gemessene erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$ . Wang *et al.* berichteten kürzlich über eine NF- $\kappa$ B-abhängige, von CD68/HLA-DR+ Makrophagen vermittelte gesteigerte Motilität von hepatozellulären Tumorzellen [175]. Ein verantwortlicher löslicher Faktor wurde nicht genannt, die in dieser Arbeit gezeigte erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration in den entsprechenden Co-Kulturen könnte jedoch in diesem Fall eine Ursache sein. Dafür spricht auch die Abhängigkeit der MMP-9-Expression von NF- $\kappa$ B, welche durch TNF- $\alpha$  induziert wird [18,176]. Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch Blockierung des TNF- $\alpha$ -Signalings zu einer verminderten Invasivität von PDAC-Zellen führt [157]. Ebenfalls vermehrt im Zellkulturüberstand von co-kultivierten M1-Makrophagen und Colo357- bzw. H6c7-Zellen detektiert wurde IL-8/CXCL8 (**Tabelle 4.11**), welches auch zur Invasion und Metastasenbildung von Tumorzellen beitragen kann [155], ebenso wie MIG/CXCL9 [161]. Die gesteigerte Invasionsfähigkeit der Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit Makrophagen im Gegensatz zu gleich behandelten H6c7-Zellen könnte auch durch die gesteigerte Menge des pro-invasiven Zytokins MIF [156] im Überstand von co-kultivierten Colo357-Zellen erklärt werden, während es in Co-Kulturen von H6c7-Zellen entweder vermindert gemessen oder gar nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Roy & Zimmermann *et al.* konnten kürzlich den Invasions-suppressiven Effekt von SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 in PDAC-Zellen *in vitro* und *in vivo* sowie die Repression von CXCL12 in PDAC-Patienten und -zelllinien zeigen [159]. In der vorliegenden Arbeit konnte CXCL12 in stark erhöhten Konzentrationen in den Überständen von H6c7-Zellen, die mit M1- und M2-Makrophagen co-kultiviert worden waren, nachgewiesen werden, während es in den Überständen von gleichbehandelten Colo357-Zellen zwar vorhanden, aber im Vergleich zur Mono-Kultur nicht erhöht war (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde untermauern die Hypothese, dass M1-Makrophagen über Faktoren wie TNF- $\alpha$ , IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9 und MIF die Invasionsfähigkeit von Colo357-Zellen erhöhen können.

Die bisher einzige Arbeit zu Makrophagen-vermittelter EMT-Induktion in PDAC-Zellen *in vitro* verwendete ein Co-Kultursystem von humanen PDAC-Zelllinien und einer murinen Makrophagenzelllinie, die mit IL-4 zu einem M2-Phänotyp differenziert wurde [83], und zeigte neben einer gesteigerten Expression von Vimentin, Snail, MMP-2 und -9 auch eine Reduktion der E-Cadherin-Expression sowie gesteigerte Proliferationsraten und Invasionsfähigkeit in den PDAC-Zellen nach Co-Kultur. Diese Beobachtungen wurden mit einer vermehrten, TLR4-abhängigen Sekretion von IL-10 durch die Makrophagen erklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, die zum Teil allerdings stärker durch M1-polarisierte Makrophagen vermittelt wurden (s.o.). Die Befunde von Liu *et al.* unterstreichen die Bedeutung von Makrophagen bei der Induktion von EMT in Pankreasgangepithelzellen. Allerdings fehlt die Co-Kultur mit M1-Makrophagen als Kontrolle fehlt in ihrer Arbeit und die Autoren räumen ein, dass die Validierung ihrer Daten im rein humanen System noch aussteht. Beide Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit erfüllt. Außerdem ist zu beachten, dass Liu *et al.* für ihre Co-Kulturen Transwell-Einsätze mit 8 µm Porengröße verwendeten, in die die Makrophagen ausgesät wurden. Eigene Untersuchungen konnten aufzeigen, dass Makrophagen innerhalb von ca. 30 – 120 Minuten zu hohen Teilen durch eine Transwellmembran mit dieser Porengröße migrierten, dort jedoch nicht adhärirten, sondern auf den Boden des Wells der Kulturplatte sanken (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob in der Arbeit von Liu *et al.* nicht auch Makrophagen in das Kompartiment der Epithelzellen gelangt waren. Dies würde bedeuten, dass zusätzlich zur wechselseitigen Kommunikation über lösliche Faktoren auch eine direkte Interaktion zwischen Makrophagen und Epithelzellen durch Zell-Zell-Kontakte stattgefunden hätte und die beobachteten Phänomene nicht allein durch lösliche Faktoren bedingt wären. Direkte Co-Kulturen von Makrophagen und PDAC-Zellen *in vitro* sind bisher nicht beschrieben, über den Einfluss eines solchen Versuchsaufbaus auf die EMT der Epithelzellen und des Phänotyps der Makrophagen lässt sich daher nur spekulieren.

Im Bezug zu den Daten von **Kapitel 4.1** und **4.2** muss eine Arbeit von Rhim *et al.* besonders hervorgehoben werden, in der ein Mausmodell mit Fluoreszenz-markierten Pankreasgangepithelzellen genutzt wurde, um das Verhalten der markierten Zellen in Modellen von ADM, PanIN, CP und PDAC genau zu verfolgen [120]. Dabei konnte gezeigt werden, dass EMT bereits in Pankreasgangepithelzellen von ADMs und

PanINs Zeichen von EMT aufweisen, und dass Zellen in PanIN-2 und -3 Läsionen zur Invasion befähigt sind und sich im Blutkreislauf nachweisen lassen, wobei sie einen mesenchymalen Phänotyp wie den von PDAC-Zellen zeigen. Außerdem wurde der Einfluss von entzündlichen Prozessen im Pankreas, induziert durch Cerulein, auf die EMT und Invasion von Pankreasgangepithelzellen dargestellt. Diese Befunde bekräftigen die Hypothese, dass entzündliche Prozesse zur Induktion von EMT in Pankreasgangepithelzellen beitragen und dass dies zu ihrer Invasion in das umliegende Gewebe sowie in den Blutkreislauf führt. Dabei weisen die Ergebnisse auch darauf hin, dass diese Ereignisse schon in den diskutierten Vorläufererkrankungen des PDACs, PanIN und CP, stattfinden. Der Beitrag von Makrophagen wurde in diesem Zusammenhang zwar nicht dargestellt, jedoch untermauern die Daten der vorliegenden Arbeit die Sichtweise, dass EMT bereits in prämaligen Pankreasgangepithelzellen durch den Einfluss von Entzündungszellen wie M1- und M2-Makrophagen erfolgen kann. Die Befunde *in situ* (**Kapitel 4.1**) und *in vitro* (**Kapitel 4.2**) weisen darüber hinaus darauf hin, dass dies auch im humanen System stattfindet.

#### **5.4 Der Einfluss von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen auf das Apoptoseverhalten von Pankreasgangepithelzellen**

Die Daten von **Kapitel 4.3** zeigen ein vermindertes Ansprechen auf den Apoptose-Stimulus TRAIL von H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung von CH11, Etoposid oder Gemzitabin unter diesen Bedingungen festgestellt wurden. Diese Befunde sind somit in Einklang mit anderen Arbeiten, die auch den Einfluss von Makrophagen auf die Apoptosesensibilität von Tumorzellen, u.a. PDAC-Zellen, zeigen konnten [177,178].

Beispielsweise demonstrierte eine Studie kürzlich eine reduzierte Wirkung von Gemzitabin auf humane PDAC-Zellen unter dem Einfluss von Makrophagen [177]. Dabei wurden Panc-1-Zellen mit Makrophagen co-kultiviert, die mit M-CSF aus humanen Monozyten differenziert worden waren. Ein Teil dieser *in vitro* polarisierten M2-Makrophagen wurde mit konditioniertem Medium aus Panc-1-Kulturen weiter differenziert (dann als „TAMs“ bezeichnet) und ebenfalls in Co-Kulturen mit Panc-1-Zellen eingesetzt. Diese auch im Mausmodell verifizierten Effekte wurden über den Abbau von Gemzitabin durch Zysteindesaminase erklärt, welche in den Panc-1 Zellen Makrophagenabhängig vermehrt exprimiert wurde, wobei als verantwortlicher löslicher Faktor IL-4 basierend auf einer vermehrt gemessenen Phosphorylierung von JAK1 und -3 hypothetisiert wurde. Der Sachverhalt, dass in der vorliegenden Arbeit in den Pankreasgangepithelzellen kein vermindertes Ansprechen auf Gemzitabin und keine erhöhten Spiegel von IL-4 nach Co-Kultur mit M2-Makrophagen gezeigt werden konnte, kann durch die Verwendung anderer Epithelzelllinien als Panc-1 erklärt werden. Außerdem waren in der Arbeit von Weizmann *et al.* die deutlichsten Effekte durch konditioniertes Medium der „TAMs“ zu sehen, welche in der vorliegenden Arbeit auch keine Verwendung fanden. Ob IL-4 tatsächlich der verantwortliche Faktor war, und wenn dem so war, ob er von den Makrophagen oder den Panc-1-Zellen sezerniert wurde, konnten Weizmann *et al.* nicht zeigen. Eine andere Studie belegt die erhöhte Chemoresistenz von PDAC-Zellen (Panc-1 und MiaPaCa) gegenüber Gemzitabin durch CXCL12 vermittelte Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR4, welcher über die FAK-, ERK- und AKT-Signalwege die Aktivität von  $\beta$ -Catenin und NF- $\kappa$ B erhöht und so die Expression der anti-apoptischen Proteine Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Survivin und Notch1 fördert [179]. Obwohl dabei rekombinantes CXCL12 eingesetzt wurde, könnte



dies auch eine potentielle Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete TRAIL-Resistenz von co-kultivierten H6c7- und Colo-357-Zellen sein. Es ist allerdings zu beachten, dass Singh *et al.* in Vorversuchen mehrere PDAC-Zelllinien auf die Expression des CXCL12-Rezeptors CXCR4 untersuchten und im Vergleich zu Panc-1- und MiaPaCa- nur eine sehr geringe Expression des Rezeptors in Colo357-Zellen fanden. Ob die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte der Makrophagen vermittelten TRAIL-Resistenz von Pankreasgangepithelzellen auch durch CXCL12 zu begründen sind, z.B. aufgrund von hochreguliertem CXCR4 nach Co-Kultur, muss daher noch untersucht werden.

Nach Stimulation mit TRAIL konnte in H6c7- und Colo357-Zellen, die mit M1- und M2-Makrophagen co-kultiviert worden waren, als erster Befund ein deutlicher Unterschied in der proteolytischen Aktivierung von Caspase-3 verglichen mit der jeweiligen Monokultur gezeigt werden (**Kapitel 4.3.1**). Die daraufhin untersuchte Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren in den Epithelzellen zeigte eine tendenziell erhöhte Expressionsrate und Verteilungsdichte des anti-apoptotischen TRAIL-Rezeptors DcR2, aber auch des Apoptose vermittelnden DR5-Rezeptors auf den H6c7-Zellen nach Co-Kultur mit beiden Makrophagenpopulationen. Letzteres war auch in Colo357-Zellen zu sehen (**Abbildung 4.32**). Während eine erhöhte Expression von DcR2 als Beitrag zur verminderten Sensibilität gegenüber TRAIL gedeutet werden kann, würde dies im Falle von DR5 das Gegenteil vermuten lassen. Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass die TRAIL-induzierte Apoptose in PDAC-Zellen (u.a. Colo357) ausschließlich über DR4 vermittelt wird, obwohl DR5 funktional exprimiert wird [180]. Die Autoren vermuten einen DR5 inaktivierenden Mechanismus in diesen Zellen, den sie jedoch bisher nicht identifizierten. Dennoch stehen ihre Befunde im Einklang mit den Ergebnissen von **Kapitel 4.3.2**. Für die Unabhängigkeit der in **Kapitel 4.3** beschriebenen Effekte von einer differenziellen Expression von DR5 und DcR2 spricht auch, dass in Ganzzelllysaten von Mono- und Co-Kulturen beider Epithelzelllinien mittels Westernblot keinerlei Unterschiede in der Gesamtexpression dieser Rezeptoren festgestellt werden konnten (**Abbildung 4.33**).

In einer Studie von Kaler *et al.* wurde eine durch die monozytäre Zelllinie THP1 und humane Monozyten (zusammenfassend als „TAMs“ bezeichnet) vermittelte Resistenz gegenüber TRAIL in Colorektalkarzinomzellen gezeigt [178]. Dabei wurde als Mechanismus die Induktion von Snail durch die Wnt-, AKT- und NF- $\kappa$ B-Signalwege,

aktiviert durch „TAM“ sezerniertes IL-1 $\beta$  identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden hohe Expressionsmengen von IL-1 $\beta$  nur in M1-Makrophagen, jedoch nicht in M2-Makrophagen detektiert (**Abbildung 4.5**), die allerdings gleichermaßen die Wirkung von TRAIL auf H6c7- und Colo357-Zellen verminderten. Als Ursache für die reduzierte Sensibilität beider Epithelzelllinien nach Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen wird die NF- $\kappa$ B-abhängige Hochregulation von c-FLIP vorgeschlagen, die eine vermehrte Inhibition der Caspase-8-Aktivierung am DISC zur Folge haben kann (**Kapitel 4.3.3 - 4.3.5**). Dabei käme als verantwortlicher Faktor das in Co-Kulturen mit M1-Makrophagen vermehrt detektierte (**Kapitel 4.4**) TNF- $\alpha$  in Frage, ein Zytokin dessen Rolle bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B lange bekannt ist [181]. Allerdings ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Co-Kulturen von H6c7- und Colo357-Zellen mit M1-Makrophagen nicht ausgeprägter als mit M2-Makrophagen (**Abbildung 4.36**), obwohl in Überständen von Co-Kulturen der Epithelzelllinien mit M1-Makrophagen erhöhte Spiegel von TNF- $\alpha$  im Vergleich zur jeweiligen Mono-Kultur gemessen wurden, während dies mit M2-Makrophagen nicht der Fall war (**Tabelle 4.11**). TNF- $\alpha$  alleine reicht als Begründung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung also nicht aus. Gleiches gilt für CXCL12 (s.o.), welches nur in Co-Kulturen von Makrophagen und H6c7-Zellen vermehrt gemessen werden konnte, obwohl die prominentesten Effekte in Colo357-Zellen beobachtet wurden.

In der Literatur sind verschiedene TGF- $\beta$ -abhängige Signalwege beschrieben, die unabhängig von der Smad-Phosphorylierung ablaufen und unter anderem über MEK1/2, AKT und ERK vermittelt werden können. Diese können zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zu anti-apoptische Effekte auf neuronale Zellen und Osteoklasten führen [182–185]. Die erhöhten Spiegel von TGF- $\beta$ 1 in Co-Kulturen von Colo357-Zellen, die mit M1- und stärker noch mit M2-Makrophagen co-kultiviert worden waren (**Abbildung 4.37**), korrelieren in ihrer Tendenz mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (**Abbildung 4.36**) und dem verminderten Ansprechen auf TRAIL-Behandlung unter den jeweiligen Kulturbedingungen. Gleiches gilt, wenn auch weniger prominent, für H6c7-Zellen. Die Gesamtexpression und Phosphorylierung von ERK in den Epithelzelllinien unter Co-Kultur mit Makrophagen wurden in der vorliegenden Arbeit bereits untersucht (Daten nicht gezeigt), wobei bisher noch keine Trends erkannt werden konnten. Untersuchungen von weiteren, an der o.g. Signaltransduktion von TGF- $\beta$  beteiligten Mediatoren wie AKT sowie der Inhibition von TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  bzw. deren Auswirkungen auf die TRAIL-Sensitivität von H6c7- und Colo357-Zellen unter

Co-Kultur wurden bereits begonnen. Des Weiteren ist die Durchführung der in **Kapitel 4.3** beschriebenen Experimente mit Co-Kulturen von H6c7- und Colo357-Zellen und frisch isolierten TAMs geplant, die bisher aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden PDAC-Gewebe nicht durchgeführt werden konnten.

Außerdem muss die Frage geklärt werden, warum in den mit Makrophagen co-kultivierten Epithelzellen keine Unterschiede im Ansprechen auf den agonistischen FAS-Antikörper CH11 im Vergleich zu den Mono-Kulturen festgestellt werden konnten (**Kapitel 4.3.1**). Die FASL-induzierte Signaltransduktion läuft, ebenso wie die von TRAIL, unter essentieller Beteiligung von Caspase-8 ab. Wenn unter den o.g. Kulturbedingungen die Caspase-8-Aktivierung durch erhöhte Expression von c-FLIP verstärkt inhibiert wird, sollte dieser Effekt auch bei Behandlung mit CH11 zu sehen sein. Einen ersten Ansatz zur Beantwortung dieser Fragestellung stellt eine geplante Analyse der Expression und Verteilungsdichte des Rezeptors FAS dar.

## 5.5 TAMs als Therapieziel

Aufgrund des geringen Prozentsatzes der für einen kurativen, chirurgischen Eingriff in Frage kommenden PDAC-Patienten und der nach wie vor unzureichend erhöhten Überlebensdauer der Patienten durch das bei dieser Erkrankung am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum Gemzitabin [186,187] werden dringend neue Therapieansätze benötigt. Dabei gewinnt das Tumorstroma des PDACs, insbesondere die TAMs, zunehmend an Bedeutung als Therapieziel.

Basierend auf dem Bild von M1-Makrophagen als anti- und M2-Makrophagen als pro-tumorigen wirkend [40,53] wurden in der letzten Dekade mehrere Strategien zur Modulation von Makrophagen in diversen Tumoren entwickelt [38,39,188–195]. Dabei nimmt die Repolarisation der M2-ähnlichen TAMs zu tumorsuppressiven M1-Makrophagen einen großen Stellenwert ein [39,190,192]. In einem Mausmodell von Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit rekombinantem GM-CSF zu einer verminderten Vaskularisierung und Metastasierung des Tumors zur Folge hat. Erklärt wurde dies durch die GM-CSF vermittelte Repolarisierung der TAMs zu einem M1-Phänotyp (definiert durch erhöhte Expression von INOS und verminderte Expression von Arginase-I, IL-4 und IL-10), was zur Freisetzung von löslichem VEGF-Rezeptor durch die Makrophagen führte [190]. Eine andere Studie zeigte eine erhöhte, kontaktabhängige Tumorzellyse durch GM-CSF repolarisierte, über vermehrte Produktion von CCL2 und CCL3 als M1-phänotypisch definierte TAMs in einem Darmkrebs- Mausmodell [192]. Für murine Ovarialkarzinomzellen sind anti-tumorigene Effekte von TAMs, die durch Inhibition der NF- $\kappa$ B-abhängigen M2-Polarisation mittels IKK $\beta$ -Inhibition repolarisiert wurden, beschrieben [39].

Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde, die zeigen, dass auch M1-polarisierte Makrophagen Malignitäts-assoziierte Effekte in Pankreasgangepithelzellen bewirken können, sollte die Strategie der Repolarisation von TAMs zu M1-Makrophagen zumindest im PDAC kritisch betrachtet werden. Dabei scheint die Verwendung von GM-CSF als polarisierendem Stimulus besonders ungeeignet. Dieses wird zudem durch die GM-CSF vermittelte Rekrutierung von MDSCs in einem Mausmodell des Pankreaskarzinoms unterstrichen, welche die Unterdrückung der T-Zell-Antwort und gesteigertes Tumorwachstum zur Folge hat [196]. Bayne *et al.* zeigten jedoch auch in PDAC-Patienten mit inoperablem Tumor teilweise Verbesserungen des Krankheitsbildes nach einer Behandlung mit einem

agonistischen CD40-Antikörper [194]. Diese Behandlung bewirkte eine Repolarisation der TAMs zu einem Phänotyp mit hochregulierter Expression von MHC-II-Molekülen und CD86 sowie erhöhter Sekretion von IL-12, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , worüber Tumorsuppressive Effekte auch im Tiermodell gezeigt werden konnten. Dieser Befund spricht gegen die hier vorgestellte Hypothese, dass M1-Makrophagen das PDAC in Entstehung und Progression fördern. Allerdings berichteten auch andere Studien als die hier vorliegende, über pro-tumorigene Eigenschaften von M1-Makrophagen. So konnten Wang *et al.* kürzlich eine gesteigerte, NF- $\kappa$ B-vermittelte Migrationsfähigkeit von Leberkarzinomzellen durch HLA-DR+ M1-Makrophagen *in vitro* nachweisen [175]. Eine andere Gruppe zeigte die M1-Makrophagen vermittelte T-Zell-Suppression im Stroma von hepatozellulären Karzinomen [197]. In murinen und humanen Pankreata wird die Bildung von ADM durch die von Makrophagen sezernierten, M1-assoziierten Faktoren CCL5 und TNF- $\alpha$  postuliert [18].

In der Zusammenschau lassen diese Erkenntnisse darauf schließen, dass eher die Gesamtheit der Makrophagen, als nur spezielle Subpopulationen ein sinnvolles Therapieziel darstellt. So zeigen erste Untersuchungen in Mausmodellen des PDAC vielversprechende Ergebnisse durch die Inhibition der Monozyten rekrutierenden Faktoren CCL2 und M-CSF bzw. ihrer Rezeptoren [193,198]. Eine weitere Strategie zur Inhibition der Monozytenrekrutierung stellt die Blockade von CXCL12, IL-1 $\beta$  und Integrin- $\alpha$ 4 $\beta$ 1 dar [199]. Ebenfalls Gegenstand der Forschung ist die Depletion sämtlicher monozytärer Phagozyten in Tumorerkrankungen. Durch Behandlung mit Trabectedin (Yondelis®), einem Alkaloid aus *Ecteinascidia turbinata*, das durch DNA-Bindung selektiv in Monozyten Apoptose auslöst, konnte bereits in diversen Mausmodellen eine signifikante Reduktion der den Tumor infiltrierenden Monozyten und der Tumolvaskularisierung erreicht werden [38]. Dieses bei Sarkompatienten bereits angewandte Medikament könnte somit auch eine Therapieoption für das PDAC darstellen.

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung

Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 8 % zählt das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) zu den bösartigsten gastrointestinalen Tumoren und ist durch ein ausgeprägtes desmoplastisches Stroma mit einem großen Anteil an Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Zahl an TAMs im Stroma mit einer niedrigeren Lebenserwartung der Patienten korreliert, die sich weiter verschlechtert, wenn die TAMs vermehrt einen anti-inflammatorischen M2-Phänotyp aufweisen. Befunde aus anderen Tumorentitäten deuten aber auch auf einen pro-inflammatorischen M1- bzw. Mischphänotyp der TAMs hin.

Um PDAC assoziierte Makrophagen besser zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Resektate von PDACs und chronischen Pankreatitiden (CPs), einer möglichen Vorläufererkrankung des PDAC, immunhistochemisch auf M1- und M2-assoziierte Marker gefärbt und die Makrophagen hinsichtlich Phänotyp, Anzahl und Verteilung untersucht. Zusätzlich wurden Makrophagen aus PDAC-Geweben frisch isoliert und mittels FACS und rtPCR charakterisiert. Zusammenfassend konnte mit diesen Untersuchungen ein gemischter Phänotyp mit M1- und M2-Charakteristika ( $\text{HLA-DR}^{\text{hoch}}$ ,  $\text{CD16}^{\text{niedrig}}$ ,  $\text{IL-1}\beta^{\text{hoch}}$ ,  $\text{TNF-}\alpha^{\text{hoch}}$  und  $\text{CD163}^{\text{hoch}}$ ,  $\text{IL-10}^{\text{hoch}}$ ) für PDAC assoziierte Makrophagen gezeigt werden.

Der Einfluss von Makrophagen aus PDACs auf prä-maligne (H6c7) und maligne (Colo357) Pankreasgangepithelzellen sollte *in vitro* mittels eines indirekten Co-Kultur-Modells untersucht und mit dem von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen verglichen werden. Dabei wurde gezeigt, dass TAMs, M1- und M2-Makrophagen sowie Makrophagen mit einem Mischphänotyp, der sich unter Co-Kultur mit Pankreasgangepithelzellen ausbildet, zur Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) von H6c7- und Colo357-Zellen beitragen können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass M1- und M2-Makrophagen die Sensibilität gegenüber dem Todesliganden TRAIL in H6c7- und Colo357-Zellen herabsetzen. Aufgrund erhöhter Spiegel von TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  unter Co-Kulturbedingungen, werden diese beiden Faktoren als verantwortliche Mediatoren für die oben genannten Phänomene postuliert.

Die Befunde dieser Arbeit deuten darauf hin, dass PDAC assoziierte Makrophagen pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen und darüber einen pro-tumorigenen Einfluss auf Pankreasgangepithelzellen schon in frühen Stadien des PDAC ausüben.

## 6.2 Summary

With a relative rate of 5-year survival of 8 %, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) ranks among the most deadly of gastrointestinal tumors and is characterized by a profound desmoplastic stroma with a high abundance of tumor associated macrophages (TAMs). It has been shown that high numbers of TAMs in the stroma correlate with a bad outcome of the patients which is even worsened if the TAMs show an anti-inflammatory M2-phenotype. Findings from other tumor entities also indicate a pro-inflammatory M1- or mixed phenotype of these TAMs.

To characterize PDAC associated macrophages in more detail, resected PDACs were stained immunochemically for M1- and M2-associated markers and analyzed with respect to phenotype, number and distribution in comparison to chronic pancreatitis (CP), a possible precursor of PDAC. Additionally, macrophages freshly isolated from PDAC tissues were characterized by FACS and rtPCR. Taken together, a mixed phenotype exhibiting M1- and M2-properties (HLA-DR<sup>high</sup>, CD16<sup>low</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>high</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>high</sup> and CD163<sup>high</sup>, IL10<sup>high</sup>) for PDAC associated macrophages was shown by these methods.

The influence of macrophages from PDAC on pre-malignant (H6c7) and malignant (Colo357) pancreatic ductal epithelial cells was analyzed *in vitro* in an indirect co-culture model and compared to that of *in vitro* generated M1- and M2-macrophages. It was shown that TAMs, M1- and M2-macrophages as well as macrophages with a mixed phenotype, the latter being acquired during co-culture with pancreatic ductal epithelial cells, can contribute to epithelial-mesenchymal transition (EMT) of H6c7- and Colo357 cells. Further it was shown that M1- and M2-macrophages reduce the sensitivity towards TRAIL-mediated apoptosis induction in H6c7- and Colo357 cells. Due to elevated levels of TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in co-culture conditions, these factors are postulated as mediators of the phenomena mentioned above.

Altogether these findings indicate that PDAC associated macrophages concomitantly exhibit pro- and anti-inflammatory properties and thereby have a pro-tumorigenic influence on pancreatic ductal epithelial cells already in early stages of PDAC.



# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ADM	Azinoduktale Metaplasie
AFL	Atypische flache Läsionen
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variances</i> )
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BRCA2	<i>Breast cancer , early onset</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CASP/Caspase	<i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CK-PAN	Zytokeratin
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CP	Chronische Pankreatitis
CSF1R	<i>Colony-stimulating factor 1 receptor</i>
CSF2R $\alpha$	<i>Colony-stimulating factor 2 receptor alpha</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
Cyt-c	Zytochrom C
DcR	<i>Decoy receptor</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	<i>Death receptor</i>
dT	Desoxythymidin
DTT	DL-Dithioereitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic-mobility-shift-assay</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
ERK	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
ETOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FADD	<i>Fas-associated death receptor</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAP-1	<i>FAS-associated –phosphatase-1</i>
FAS	<i>First apoptosis signal</i>
FASL	<i>First apoptosis signal ligand</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcR	<i>Fragment crystallizable receptor</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FSC	<i>Forward side scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor-1<math>\alpha</math></i>
HLA-DR	<i>Human leucocyte antigen-DR</i>
HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gamma

IFN- $\gamma$ R	Interferon- $\gamma$ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-4R $\alpha$	Interleukin-4 Rezeptor alpha
IPMN	Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
KRAS2	<i>K-rat sarcoma 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m/v	Masse pro Volumen
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mA	Milliampere
MAPkinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
MCP-1	<i>Monocyte chemottractant protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinasekinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mV	Millivolt
N	Normal
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NK- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p	P-Wert
PAA	Polyacrylamid
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin E
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
rDNase	Rekombinante Desoxyribonuklease
rF	Relative Luftfeuchtigkeit
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNI	<i>Reactive nitrogen intermediate</i>
ROI	<i>Reactive oxygen intermediate</i>
RPMI	Medium, benannt nach Roswell Park Memorial Institut
rtPCR	<i>Realtime polymerase-chain-reaction</i>
SA	Standardabweichung
SDF	<i>Stromal cell derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIP1	<i>Smad interacting protein 1</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic rich in cysteine</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	<i>Sris buffer saline</i>
TC	tubulärer Komplex
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>

TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
U	Units
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
w/v	Masse pro Volumen
ZEB-2	<i>Zinc finger E-box-binding protein</i>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Histologische Darstellung von gesunden, interlobulären Pankreasgängen, PanINs und PDACs.	2
1.2	Makrophagenpolarisierung nach dem binären System von M1- und M2-Polarisation.	9
1.3	Signaltransduktion der M1- und M2-Polarisierung.	10
1.4	Schematische Darstellung EMT-assoziiierter Veränderungen in Epithelzellen.	17
1.5	Schematische Darstellung des Trail-Signalwegs.	21
3.1	Typischer Versuchsaufbau einer Mono- und Co-Kultur aus Pankreasgangepithelzellen und Makrophagen.	45
3.2	Graphische Darstellung der Auswertung des Invasionsassays.	55
4.1	Detektion von Makrophagenpopulationen in CP-Resektaten.	65
4.2	Detektion von Makrophagenpopulationen in PDAC-Resektaten.	66
4.3	Durchflusszytometrische Charakterisierung von TAMs aus PDAC-Geweben im Vergleich zu <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen.	74
4.4	Magnetische Bead-Separation verändert nicht den Phänotyp der TAM-Population.	75
4.5	Charakterisierung von M1-Makrophagen, M2-Makrophagen und TAMs mittels rtPCR.	76
4.6	H6c7- und Colo357-Zellen erwerben in Gegenwart von PDAC assoziierten Makrophagen eine spindelförmige Morphologie.	78
4.7	PDAC assoziierte Makrophagen verändern die Expression von EMT-Markern in H6c7- und Colo357 Zellen.	79
4.8	Differenzielles Überleben von M1- und M2-Makrophagen unter Kulturbedingungen.	80
4.9	Differenzielle Zelldichte unterschiedlicher Mengen ausgesäter M1- und M2-Makrophagen.	82
4.10	Eine ähnliche Zellzahl von M1- und M2-Makrophagen nach 5 Tagen Kultur kann durch die Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen erreicht werden.	83
4.11	H6c7- und Colo357-Zellen erwerben in Gegenwart von <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen eine EMT-assoziierte Spindelform.	84
4.12	Analyse von epithelialen und mesenchymalen Markern in H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur mit <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen mittels rtPCR.	85

4.13	Analyse von epithelialen und mesenchymalen Markern in H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur mit <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen mittels Westernblot.	86
4.14	E-Cadherin transloziert nach Co-Kultur mit <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen von der Zelloberfläche ins Zytoplasma von H6c7- und Colo357-Zellen.	87
4.15	<i>In vitro</i> generierte M1- und M2-Makrophagen induzieren die Expression von L1CAM und Vimentin in H6c7- und Colo357-Zellen.	88
4.16	<i>In vitro</i> polarisierte M1- und M2-Makrophagen erhöhen die Zellinvasion von Colo357-Zellen.	89
4.17	<i>In vitro</i> polarisierte M1- und M2-Makrophagen verändern die Expression von Matrixmetalloproteasen in H6c7 und Colo357 Zellen.	90
4.18	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen nehmen unter Co-Kulturbedingungen eine M2-ähnliche Morphologie an.	92
4.19	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Macrophagen weisen nach Co-Kultur mit H6c7 und Colo357-Zellen vermehrt M2-charakteristische Oberflächenmarker auf.	93
4.20	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Macrophagen weisen nach Co-Kultur mit H6c7- und Colo357-Zellen M2-Characteristika auf RNA-Ebene auf.	94
4.21	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen nehmen unter Co-Kultur mit H6c7-Zellen in Anwesenheit von GM-CSF keine M2-ähnliche Morphologie an.	95
4.22	GM-CSF inhibiert die Expression von M2-assoziierten Oberflächenmarkern in co-kultivierten M1-Makrophagen.	96
4.23	GM-CSF inhibiert die Expression von M2-assoziierten und steigert die Expression von M1-assoziierten Genen in co-kultivierten M1-Makrophagen.	97
4.24	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren eine spindelförmige Morphologie in H6c7- und Colo357-Zellen.	99
4.25	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Translokation von E-Cadherin in H6c7- und Colo357-Zellen.	100
4.26	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Expression von L1CAM in H6c7- und Colo357-Zellen.	101
4.27	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Expression von Vimentin in H6c7- und Colo357-Zellen.	102
4.28	<i>In vitro</i> polarisierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp induzieren die Expression von Snail in H6c7- und Colo357-Zellen.	103

4.29	<i>In vitro</i> generierte M1-Makrophagen mit stabilem Phänotyp fördern die Invasivität von Colo357-Zellen.	104
4.30	<i>In vitro</i> polarisierte M1- und M2-Makrophagen reduzieren die Caspase-3/7-Aktivität in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.	106
4.31	In co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen ist nicht die Expression der Procaspase-3, aber deren Aktivierung durch TRAIL vermindert.	107
4.32	Die Oberflächenexpression von TRAIL-Rezeptoren ist in H6c7- und Colo357-Zellen nach Co-Kultur mit Makrophagen weitgehend unverändert.	109
4.33	<i>In vitro</i> polarisierte M1- und M2-Makrophagen beeinflussen nicht die Gesamtexpression von TRAIL-Rezeptoren in H6c7- und Colo357-Zellen.	110
4.34	In co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen ist nicht die Expression der Procaspase-8, aber deren Aktivierung durch TRAIL vermindert..	112
4.35	Erhöhte Expression von c-FLIP in co-kultivierten H6c7-und Colo357-Zellen.	113
4.36	Erhöhte Aktivierung von NF-κB in co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.	114
4.37	Erhöhte Spiegel von TGF-β1 im Zellkulturüberstand von co-kultivierten H6c7- und Colo357-Zellen.	117



## Tabellenverzeichnis

1.1	Häufige Genmutationen und zellbiologische Alterationen im PDAC und PanINs	4
4.1	Charakteristika von CP- und PDAC-Patienten	60
4.2	Scoring-System für die Voreinteilung von Epithel- und Stroma-Markern in CP- und PDAC-Geweben	60
4.3	Angepasstes Scoring-System für die Einteilung von Epithel- und Stroma-Markern in CP- und PDAC-Geweben	61
4.4	Scoring-System für die Auswertung der Lokalisation und numerischer Zellzählungen von Epithel- und Stroma-Markern in CP- und PDAC-Geweben	62
4.5	Gruppenvergleich von epithelialen und Stroma-assoziierten Markern zwischen CP und PDAC.	63
4.6	Statistische Auswertung des Gruppenvergleichs von epithelialen und Stroma assoziierten Markern zwischen CP und PDAC.	67
4.7	Korrelation von Makrophagenmarkern, $\alpha$ -SMA und Ki67 in CP-Resektaten.	69
4.8	Korrelation von Makrophagenmarkern, $\alpha$ -SMA, Ki67 und Grading in PDAC-Resektaten.	70
4.9	Mittelwerte der durchflusszytometrischen Analyse frisch isolierter TAMs von PDAC-Patienten.	73
4.10	Mittelwerte der durchflusszytometrischen Charakterisierung von <i>in vitro</i> generierten M1- und M2-Makrophagen.	73
4.11	Veränderte Spiegel von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen von H6c7- und Colo357-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur mit M1- und M2-Makrophagen.	119

## Literaturverzeichnis

1. Bundes-Gesundheitsberichterstattung (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010 9 Ausgabe.
2. Sternheim E, Voigt J, Kaspar W, Dippold W (1986) Das Pankreaskarzinom. *Internist* 41: 848–854, 856–859.
3. Farrow B, Evers BM (2002) Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 10: 153–169.
4. Brune K a, Lau B, Palmisano E, Canto M, Goggins MG, et al. (2010) Importance of age of onset in pancreatic cancer kindreds. *J Natl Cancer Inst* 102: 119–126.
5. Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, et al. (2011) Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* 47: 1928–1937.
6. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, et al. (2009) ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 424–431.
7. Logsdon C, Simeone D, Binkley C (2003) Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 63: 2649–2657.
8. Grover S, Syngal S (2004) Hereditary pancreatic cancer. *Gastroenterology* 139: 1076–1080.
9. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2009) Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6: 699–708.
10. Ojajärvi I, Partanen T (2000) Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occup Env Med* 25: 721–730.
11. Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter a M, Klöppel G (2012) [New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]. *Pathologe* 33 Suppl 2: 189–193.
12. Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Klöppel G (2009) Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology* 9: 45–54.
13. Han H, Von Hoff DD (2013) SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer Cell* 23: 424–424.e1.
14. Maitra A, Hruban R (2008) Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3: 157–188.
15. Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005) Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology* 128: 1606–1625.

16. Lüttges J, Klöppel G (2005) [Pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursors]. *Pathologe* 26: 12–17.
17. Deschênes-Simard X, Mizukami Y, Bardeesy N (2013) Macrophages in pancreatic cancer: starting things off on the wrong track. *J Cell Biol* 202: 403–405.
18. Liou G-Y, Döppler H, Necela B, Krishna M, Crawford HC, et al. (2013) Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- $\kappa$ B and MMPs. *J Cell Biol* 202: 563–577.
19. Erkan M, Hausmann S (2012) The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev* 9: 22710569.
20. Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, et al. (2007) Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer* 121: 699–705.
21. Korc M (2007) Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg* 194: S84–6.
22. Muerkoster SS, Werbinger V, Koch D, Sipos B, Ammerpohl O, et al. (2008) Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma--epigenetic downregulation of caspases. *Int J Cancer* 123: 1751–1760.
23. Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M (2004) Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and. *Cancer Res* 64: 1331–1337.
24. Evans A, Costello E (2012) The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion. *Front Physiol* 3: 270.
25. Strouch MJ, Cheon EC, Salabat MR, Krantz SB, Gounaris E, et al. (2010) Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clin Cancer Res* 16: 2257–2265.
26. Pilon-Thomas S, Nelson N, Vohra N, Jerald M, Pendleton L, et al. (2011) Murine pancreatic adenocarcinoma dampens SHIP-1 expression and alters MDSC homeostasis and function. *PLoS One* 6: e27729.
27. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S (2006) Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12: 5423–5434.
28. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, et al. (2011) Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* 208: 469–478.
29. Farrow B, Albo D, Berger DH (2008) The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer. *J Surg Res* 149: 319–328.

30. Esposito I, Penzel R, Chaib-Harriche M, Barcena U, Bergmann F, et al. (2006) Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol* 208: 673–685.
31. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson D a, et al. (2007) Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res* 67: 9518–9527. 4.
32. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013
33. Mahadevan D, Von Hoff DD (2007) Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 6: 1186–1197.
34. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, et al. (2012) The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18: 4266–4276.
35. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, et al. (2011) Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60: 861–868.
36. Mielgo A, Schmid MC (2013) Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. *BMB Rep* 46: 131–138.
37. Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F (2011) Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin Dev Immunol* 2011: 565187.
38. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, et al. (2013) Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 23: 249–262.
39. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles K a, Kulbe H, et al. (2008) “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med* 205: 1261–1268.
40. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42: 717–727.
41. Heusinkveld M, van der Burg SH (2011) Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 9: 216.
42. Hanahan D, Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21: 309–322.
43. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler C a, Friess H, et al. (2004) Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 91: 586–594.

44. Dale DC, Boxer L, Liles WC (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935–945.
45. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953–964.
46. Grage-Griebenow E, Lorenzen D, Fetting R, Flad HD, Ernst M (1993) Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur J Immunol* 23: 3126–3135.
47. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35.
48. Martinez F, Sica A (2007) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453–461.
49. Mackaness GB (1964) The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med*: 105–120.
50. Stein BM, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992) Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. *J Exp Med* 176: 287–292.
51. Goerdts S, Orfanos CE (1999) Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10: 137–142.
52. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677–686.
53. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549–555.
54. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958–969.
55. Ambarus C a, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, et al. (2012) Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 375: 196–206.
56. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill a M (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166–6173.
57. Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344–346.
58. Martinez F, Gordon S (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177: 7303–7311.

59. Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27: 451–483.
60. Duffield JS (2003) The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 104: 27–38.
61. Verreck F a W, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve M a, Kramer M, et al. (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4560–4565.
62. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229: 176–185.
63. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11: 889–896.
64. Lawrence T, Natoli G (2011) Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11: 750–761.
65. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30: 1073–1081.
66. Schmieder A, Michel J, Schönhaar K, Goerdts S, Schledzewski K (2012) Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin Cancer Biol* 22: 289–297.
67. Cobbs CS, Whisenant TR, Wesemann DR, Harkins LE, Meir EG Van, et al. (2003) Inactivation of Wild-Type p53 Protein Function by Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Malignant Glioma Cells. *Cancer Res* 63: 8670–8673.
68. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, et al. (2007) The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67: 585–592.
69. Qian B-Z, Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39–51..
70. Pollard J (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4: 1–8.
71. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33: 119–126.
72. Mantovani A, Sica A (2010) Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 22: 231–237.

73. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196: 254–265.
74. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, et al. (2004) Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res* 24: 3335–3342.
75. Hanada T, Nakagawa M, Emoto a, Nomura T, Nasu N, et al. (2000) Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* 7: 263–269.
76. Lee C-H, Espinosa I, Vrijaldenhoven S, Subramanian S, Montgomery KD, et al. (2008) Prognostic significance of macrophage infiltration in leiomyosarcomas. *Clin Cancer Res* 14: 1423–1430. 4.
77. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, et al. (2006) A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107: 2112–2122.
78. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, et al. (2004) A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Res* 64: 7022–7029.
79. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, et al. (2009) Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 167: e211–9.
80. Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, et al. (2013) M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration of regional lymph nodes is associated with nodal lymphangiogenesis and occult nodal involvement in pN0 pancreatic cancer. *Pancreas* 42: 155–159.
81. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, et al. (2013) Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108: 914–923.
82. Yoshikawa K, Mitsunaga S, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, et al. (2012) Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer Sci* 103: 2012–2020.
83. Liu C-Y, Xu J-Y, Shi X-Y, Huang W, Ruan T-Y, et al. (2013) M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest* 93: 844–854.
84. Neyen C, Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Maniati E, Bossard M, et al. (2013) Macrophage scavenger receptor a promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer. *J Immunol* 190: 3798–3805.

85. Gardian K, Janczewska S, Olszewski WL, Durlik M (2012) Analysis of pancreatic cancer microenvironment: role of macrophage infiltrates and growth factors expression. *J Cancer* 3: 285–291.
86. Cavel O, Shomron O, Shabtay A, Vital J, Trejo-Leider L, et al. (2012) Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor. *Cancer Res* 72: 5733–5743.
87. Greenburg G, Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95: 333–339.
88. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442–454.
89. Peinado H, Portillo F, Cano A (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48: 365–375.
90. Bornslaeger E a, Corcoran CM, Stappenbeck TS, Green KJ (1996) Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 134: 985–1001.
91. Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, et al. (2008) Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68: 989–997.
92. Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 131–142.
93. Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED (2005) Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179: 11–23.
94. Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG (1997) Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273: F563–74.
95. Natalwala A (2008) Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 14: 3792.
96. Mannello F, Tonti G a M, Bagnara GP, Papa S (2006) Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 475–481.
97. Moustakas A, Heldin C-H (2007) Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98: 1512–1520.



98. Polyak K, Weinberg R a (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265–273.
99. Yang J, Weinberg R a (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14: 818–829.
100. Massagué J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215–230.
101. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, et al. (2004) NF- $\kappa$ B is essential for epithelial- mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114: 569–581.
102. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, et al. (2008) Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 130: 481–494.
103. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428.
104. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 117–134. Available:
105. Huber M a, Kraut N, Beug H (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548–558.
106. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, et al. (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 179: 56–65.
107. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T (2009) E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28: 151–166.
108. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y (2009) Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 15: 195–206.
109. Miyazono K (2009) Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Japan Acad Ser B* 85: 314–323.
110. Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J* 3: 1–10.

111. Geismann C, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, et al. (2009) Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res* 69: 4517–4526.
112. Raveh S, Gavert N, Ben-Ze'ev A (2009) L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett* 282: 137–145.
113. Sebens Mürköster S, Werbing V, Sipos B, Debus M a, Witt M, et al. (2007) Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene* 26: 2759–2768.
114. Schäfer H, Struck B, Feldmann E-M, Bergmann F, Grage-Griebenow E, et al. (2013) TGF- $\beta$ 1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells. *Oncogene* 32: 180–189.
115. Boo Y-J, Park J-M, Kim J, Chae Y-S, Min B-W, et al. (2007) L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 14: 1703–1711.
116. Von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, et al. (2009) E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 137: 361–71, 371.e1–5.
117. Ben Q-W, Wang J-C, Liu J, Zhu Y, Yuan F, et al. (2010) Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 17: 2213–2221.
118. Cates J, Byrd R, Fohn L (2009) Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 38: 1–12.
119. Bergmann F, Wandschneider F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B, et al. (2010) Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 24: 909–915.
120. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, et al. (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148: 349–361.
121. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776.
122. MacFarlane M (2003) TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* 139: 89–97.
123. Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2: 420–430.

124. Mariani SM, Krammer PH (1998) Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* 28: 973–982.
125. Wang S, El-Deiry WS (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628–8633.
126. Green DR (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102: 1–4.
127. Hanahan D, Weinberg R a (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.
128. Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2008) Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 7: 64.
129. Röder C, Trauzold A, Kalthoff H (2011) Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cell Biol* 90: 450–455.
130. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho R a (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20: 1218–1249.
131. Esposito I, Kleeff J, Abiatari I, Shi X, Giese N, et al. (2007) Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer. *J Clin Pathol* 60: 885–895.
132. Bhanot U, Heydrich R, Möller P, Hasel C (2006) Survivin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): steady increase along the developmental stages of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 30: 754–759.
133. Ungefroren H, Kruse ML, Trauzold a, Roeschmann S, Roeder C, et al. (2001) FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 114: 2735–2746.
134. Arlt a, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, et al. (2001) Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20: 859–868.
135. Muerkoster S, Arlt A, Witt M, Gehrz A, Hays S, et al. (2003) Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 104: 469–476.
136. Thomas RP, Farrow BJ, Kim S, May MJ, Hellmich MR, et al. (2002) Selective targeting of the nuclear factor-kB pathway enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated pancreatic cancer cell death. *Surgery* 132: 127–134.

137. Umemura N, Saio M, Suwa T, Kitoh Y, Bai J, et al. (2008) Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* 83: 1136–1144.
138. Torroella-Kouri M, Silvera R, Rodriguez D, Caso R, Shatry A, et al. (2009) Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Res* 69: 4800–4809.
139. Laoui D, Movahedi K, Overmeire EVAVAN, Bossche JANVANDEN, Schoupe E, et al. (2011) Tumor-associated macrophages in breast cancer : distinct subsets , distinct functions: 861–867.
140. Rivera LB, Bergers G (2013) Location, Location, Location: Macrophage Positioning within Tumors Determines Pro- or Antitumor Activity. *Cancer Cell* 24: 687–689.
141. Wu Y, Zheng L (2012) Dynamic education of macrophages in different areas of human tumors. *Cancer Microenviron* 5: 195–201.
142. Liu N, Furukawa T, Kobari M, Tsao MS (1998) Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 153: 263–269.
143. Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M, et al. (2003) A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch* 442: 444–452.
144. Arlt A, Gehrz A, Muerköster S, Vorndamm J, Kruse M-L, et al. (2003) Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 22: 3243–3251.
145. Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts J-H, Korniienko O, et al. (2012) Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. *Carcinogenesis* 33: 84–93.
146. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH (2009) Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One* 4: e7475.
147. Gottfried E, Kunz-Schughart L a, Weber a, Rehli M, Peuker a, et al. (2008) Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 67: 453–463.
148. Biswas S, Sica A, Lewis C (2008) Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 180: 2011–2017.

149. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, et al. (2006) Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 211: 473–486.
150. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston A-T, et al. (2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 5: e8852.
151. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol a-C, Léone C, Samah B, et al. (2005) Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 142: 481–489.
152. Stout R, Jiang C, Matta B (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J immunol* 175: 342–349.
153. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2: 301–310.
154. Yoshimoto T, Morishima N, Okumura M (2009) Interleukins and cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 1: 825–844.
155. Gales D, Clark C, Manne U, Samuel T (2013) The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN Oncol* 2013: 859154.
156. He X-X, Chen K, Yang J, Li X-Y, Gan H-Y, et al. (2009) Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol Med* 15: 1–10.
157. Egberts J-H, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, et al. (2008) Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68: 1443–1450.
158. Wang CY, Cusack JC, Liu R, Baldwin a S (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5: 412–417.
159. Roy I, Zimmerman NP, Mackinnon a C, Tsai S, Evans DB, et al. (2014) CXCL12 Chemokine Expression Suppresses Human Pancreatic Cancer Growth and Metastasis. *PLoS One* 9: e90400.
160. Sánchez-Martín L, Estecha A, Samaniego R, Sánchez-Ramón S, Vega MÁ, et al. (2011) The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* 117: 88–97.
161. Chang K-P, Wu C-C, Fang K-H, Tsai C-Y, Chang Y-L, et al. (2013) Serum levels of chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49: 802–807.

162. Steele CW, Jamieson NB, Evans TRJ, McKay CJ, Sansom OJ, et al. (2013) Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108: 997–1003.
163. Thiery JP (2003) Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15: 740–746.
164. Mantovani A, Romero P, Palucka a K, Marincola FM (2008) Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 371: 771–783.
165. Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK (2011) Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol* 41: 2522–2525.
166. Van Ginderachter J a, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, et al. (2006) Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211: 487–501.
167. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, et al. (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18: 349–355.
168. Wang B, Li Q, Qin L, Zhao S, Wang J, et al. (2011) Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II(hi) to MHC class II(low) mediates tumor progression in mice. *BMC Immunol* 12: 43.
169. Nakanishi Y, Nakatsuji M, Seno H, Ishizu S, Akitake-Kawano R, et al. (2011) COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in *ApcMin/+* mouse polyps. *Carcinogenesis* 32: 1333–1339.
170. Sacconi A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, et al. (2006) p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66: 11432–11440.
171. Wang Y-C, He F, Feng F, Liu X-W, Dong G-Y, et al. (2010) Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res* 70: 4840–4849.
172. Lin EY, Nguyen a V, Russell RG, Pollard JW (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193: 727–740.
173. Bonde A-K, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener R a (2012) Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 12: 35.
174. Tan TK, Zheng G, Hsu T-T, Wang Y, Lee VWS, et al. (2010) Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells. *Am J Pathol* 176: 1256–1270.

175. Wang H, Wang X, Li X, Fan Y, Li G, et al. (2014) CD68(+)HLA-DR(+) M1-like macrophages promote motility of HCC cells via NF- $\kappa$ B/FAK pathway. *Cancer Lett* 345: 91–99.
176. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, et al. (2004) Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25: 1543–1549.
177. Weizman N, Krelin Y, Shabtay-Orbach a, Amit M, Binenbaum Y, et al. (2013) Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene*: 1–8.
178. Kaler P, Galea V, Augenlicht L, Klampfer L (2010) Tumor associated macrophages protect colon cancer cells from TRAIL-induced apoptosis through IL-1beta-dependent stabilization of Snail in tumor cells. *PLoS One* 5: e11700.
179. Singh S, Srivastava SK, Bhardwaj a, Owen LB, Singh a P (2010) CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy. *Br J Cancer* 103: 1671–1679.
180. Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, et al. (2010) TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J Mol Med (Berl)* 88: 729–740.
181. Tartaglia L a, Goeddel D V (1992) Two TNF receptors. *Immunol Today* 13: 151–153.
182. Gingery A, Bradley E, Pederson L (2008) TGF- $\beta$  coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NF $\kappa$ B and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res* 314: 2725–2738.
183. König H-G, Kögel D, Rami A, Prehn JHM (2005) TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling. *J Cell Biol* 168: 1077–1086.
184. Gingery A, Bradley E, Shaw A, Oursler MJ (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase coordinately activates the MEK/ERK and AKT/NF $\kappa$ B pathways to maintain osteoclast survival. *J Cell Biochem* 89: 165–179.
185. Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, Takayanagi H, Sawada Y, et al. (2000) Reciprocal role of ERK and NF- $\kappa$ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol* 148: 333–342.
186. Tempero M, Plunkett W, Ruiz Van Haperen V, Hainsworth J, Hochster H, et al. (2003) Randomized phase II comparison of dose-intense gemcitabine: thirty-minute infusion and fixed dose rate infusion in patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 21: 3402–3408.

187. Loehrer PJ, Feng Y, Cardenes H, Wagner L, Brell JM, et al. (2011) Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 29: 4105–4112.
188. Jaffee E, Hruban R (2001) Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor–secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 19: 145–156.
189. Lutz E, Yeo C, Lillemoe K (2011) A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma: a phase II trial of. *Ann Surg* 253: 328–335.
190. Eubank T, Roberts R, Khan M (2009) CSF INHIBITS BREAST CANCER GROWTH AND METASTASIS BY INVOKING AN ANTI-ANGIOGENIC PROGRAM IN TUMOR-EDUCATED MACROPHAGES. *Cancer Res* 69: 2133–2140.
191. Szomolay B, Eubank TD, Roberts RD, Marsh CB, Friedman A (2012) Modeling the inhibition of breast cancer growth by GM-CSF. *J Theor Biol* 303: 141–151.
192. Shinohara H, Yano S (2000) chemokine secretion and enhancement of contact-dependent macrophage cytotoxicity by engineered expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 164: 2728–2737.
193. Sanford DE, Belt B a, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, et al. (2013) Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res* 19: 3404–3415.
194. Beatty G, Chiorean E, Fishman M (2011) CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* (80- ) 331: 1612–1616.
195. Schmid M, Avraamides C, Dippold H (2011) Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3ky, a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell* 19: 715–727.
196. Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, et al. (2012) Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 21: 822–835.
197. Kuang D-M, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang J-P, et al. (2009) Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 206: 1327–1337.
198. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt B a, Zhu Y, et al. (2013) Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* 73: 1128–1141.



199. Schmid M, Avraamides C, Foubert P (2011) Combined blockade of integrin- $\alpha 4\beta 1$  plus cytokines SDF-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Res* 71: 6965–6975.

## Lebenslauf / Publikationsverzeichnis

### Persönliche Daten

Name	Sven Ole Helm
Geburtsdatum/-ort	24.11.1981 in Hamburg
Nationalität	deutsch

### Wissenschaftlicher Werdegang

1993-2000	Schulbesuch am Gymnasium Neu Wulmstorf;  Abschluss: Abitur
2005-12/2010	Studiengang Pharmazie an der Christian-Albrechts Universität (CAU) zu Kiel  Abschluss: Staatsexamen und Diplom  Diplomarbeit in der klinischen Pharmazie und im Labor für molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, UKSH, Campus Kiel: <i>Der Einfluss der JNK-Inhibition auf die Smad3 vermittelte VEGF-Produktion in humanen Pankreasgang-epithelzellen.</i>
01/11-2014	Promotion an der CAU Kiel  Institut für Experimentelle Medizin  AG Inflammatorische Karzinogenese  Titel Doktorarbeit: <i>Charakterisierung von Makrophagen im duktalem Pankreasadenokarzinom und ihr Einfluss auf prä-maligne und maligne Pankreasgangepithelzellen</i>

## Publikationsverzeichnis

### 1. Originalarbeiten

1. Ungefroren H, Sebens S, Giehl K, **Helm O**, Groth S, Fändrich F, Röcken C, Sipos B, Lehnert H, Gieseler F (2014) Rac1b negatively regulates TGF- $\beta$ 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signaling. *Oncotarget*. 5(1): 277-290.
2. **Helm O**, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren U, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S (2014) Tumor associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2014 Jan 23. doi: 10.1002/ijc.28736. [Epub ahead of print]
3. **Helm O**, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg H-H, Wesch D, Sebens S (2014) Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. In press bei PlosOne.
4. Hattermann K, Sebens S, **Helm O**, Mentlein R, Mehdorn HM, Janka Held-Feindt J (2014) Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. In press bei *Oncology Reports*

### 2. Kongressbeiträge

#### a) Nicht-zitable Beiträge

1. **Helm O**, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Schäfer H, Sebens S (2011) The role of pro-and anti-inflammatory Macrophages in the genesis of the pancreatic ductal adenocarcinoma. 34<sup>th</sup> symposium of the north-german immunologists in Borstel.
2. **Helm O**, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Schäfer H, Sebens S (2011) Die Rolle von pro- und antiinflammatorischen Makrophagen in der Tumorigenese des duktaalen Pankreasadenokarzinoms. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs in Marburg.
3. **Helm O**, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Schäfer H, Sebens S (2012) The influence of tumor-associated macrophages on the genesis of the ductal pancreatic adenocarcinoma. 35<sup>th</sup> symposium of the north-german immunologists in Borstel.

## b) Zitable Beiträge

1. **Helm O**, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Schäfer H, Sebens S (2012) Die Bedeutung von pro- und antiinflammatorischen Makrophagen in der Tumorigenese des duktaalen Pankreasadenokarzinoms. *Z Gastroenterol* 50: 799.
2. Arfmann-Knübel S, Kruppa M, Großmann M, Lenk L, **Helm O**, Sebens S, Schäfer H (2013) Einfluss des anti-oxidativen Transkriptionsfaktors Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) auf die Migration und EMT von benignen und malignen Pankreasgangepithelzellen. *Z. Gastroenterol* 51: 881.
3. Grage-Griebenow E, Goebel L, Gorys A, **Helm O**, Mennrich R, Freitag-Wolf S, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S (2014) Regulatory T-cells and CD4+T-effector cells both mediate epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal epithelial cells. *Oncol Res Treat* 37(suppl1): 127

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Susanne Sebens für die Bereitstellung des Themas, hervorragende Betreuung, stetes Engagement und die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ich danke auch Thomas Kunze für die Übernahme des 2. Gutachtens.

Bei meiner Arbeitsgruppe (Anna Broich, Evelin Grage-Griebenow, Lisa Goebel, Dagmar Leisner, Lennart Lenk, Ruben Menrich, Maren Pein und Tilo Rättsch) bedanke ich mich für technische und moralische Unterstützung.

Ich danke besonders auch Heiner Schäfer für die Kooperation und guten Rat sowie seiner Arbeitsgruppe (Iris Bauer, Maike Großmann, Maike Witt-Ramdohr) für die Unterstützung.

Ich danke auch Alexander Arlt, Claudia Geismann und Frauke Grohmann für die Kooperation und Beratung, Anja Trauzold und ihrer AG für die Kooperation.

Des Weiteren danke ich dem Institut für Immunologie des UKSH Campus Kiel für die Erlaubnis der Nutzung des FACS, Holger Kalthoff für die Bereitstellung der Patientendaten, Janka Held-Feindt und Jörg Krause für die Bereitstellung der TAMs, Thomas Becker, Uwe Krüger, Alexander Leins, Ilka Vogel und Michael Ebsen für die Bereitstellung der PDAC-Resektate, Christoph Röcken und Sandra Krüger für die Bereitstellung und Färbung Sandra Krüger der PDAC-, Bence Sipos für die Bereitstellung der CP-Präparate, Sandra Freitag-Wolf für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie Erika Kaltenhäuser, Christina Trabant und Stefan Ehlers für die Isolation und Bereitstellung der Monozyten.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema "Charakterisierung von Makrophagen im duktalem Pankreasadenokarzinom und ihr Einfluss auf prämaligne und maligne Pankreasgangepithelzellen" eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner Betreuer in der AG Inflammatorische Karzinogenese, Institut für experimentelle Medizin, UKSH Campus Kiel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- und Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch wurde sie zur Veröffentlichung eingereicht. Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, 17.04.2014

Unterschrift